

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>cre-3</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/ 01908</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>09/07/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>10/07/1997</b>
Anmelder <b>RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:  
Abb. Nr. \_\_\_\_\_
  - ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
  - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
  - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 G01N21/64 G02B21/06 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY) 18. August 1994 siehe Seite 3, Zeile 12 - Seite 4, Zeile 2	1
X	siehe Seite 13, letzter Absatz - Seite 16, Zeile 17 siehe Seite 18, Zeile 11 - Seite 22, Zeile 11	3,7
Y	siehe Seite 23, Zeile 1 - Seite 25, Zeile 18; Abbildungen 1-8	10
Y	EP 0 732 584 A (IBM) 18. September 1996 siehe Spalte 5, Zeile 28 - Zeile 42 siehe Spalte 13, Zeile 39 - Zeile 45 siehe Spalte 14, Zeile 7 - Zeile 28 siehe Spalte 16, Zeile 41 - Spalte 17, Zeile 7 siehe Spalte 17, Zeile 17 - Zeile 22 siehe Abbildung 8	10
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomas, R.M.

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A-	WO 96 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY) 10. Oktober 1996 siehe Seite 4, letzter Absatz siehe Seite 12, Zeile 18 - Zeile 20 siehe Seite 57, Zeile 13 - Zeile 15 siehe Seite 70, Zeile 18 - Zeile 26 siehe Seite 71, Zeile 12 - Seite 72, Zeile 33 siehe Seite 92, Absatz 1 siehe Seite 140, Zeile 1 - Zeile 3 ---	10,11
A	B.BAILEY et al: "Optical subsectioning and multiple focal-plan imaging in the standing-wave fluorescence microscope" PROCEEDINGS 52nd ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159 XP002085004 siehe Seite 159, Zeile 15 - Zeile 17 ---	11
A	WO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 8. August 1996 siehe Seite 3, Zeile 14 - Seite 4, Zeile 11 siehe Seite 6, Zeile 26 - Seite 7, Zeile 6 siehe Seite 15, Zeile 6 - Seite 17, Zeile 27; Abbildungen 2-6 ---	1
A	W. DENK ET AL: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" SCIENCE., Bd. 248, Nr. 4951, 6. April 1990, Seiten 73-76, XP000381741 Washington DC in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	8
A	US 4 621 911 A (LANNI) 11. November 1986 in der Anmeldung erwähnt ---	
A	V. KRISHNAMURTHI ET AL: "Image processing in 3-D standing-wave fluorescence microscopy" PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, Bd. 2655, - 1996 Seiten 18-25, XP002085003 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/E 98/01908

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9418594 A	18-08-1994	US 5394268 A AU 691173 B AU 6169994 A CA 2155521 A EP 0682780 A JP 8509817 T US 5801881 A	28-02-1995 14-05-1998 29-08-1994 18-08-1994 22-11-1995 15-10-1996 01-09-1998
EP 0732584 A	18-09-1996	US 5624845 A US 5609744 A US 5607568 A US 5538898 A JP 8256755 A	29-04-1997 11-03-1997 04-03-1997 23-07-1996 08-10-1996
WO 9631522 A	10-10-1996	US 5720928 A AU 5532196 A EP 0871640 A	24-02-1998 23-10-1996 21-10-1998
WO 9624082 A	08-08-1996	US 5671085 A AU 4773896 A CA 2210801 A EP 0807273 A	23-09-1997 21-08-1996 08-08-1996 19-11-1997
US 4621911 A	11-11-1986	NONE	

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 13 SEP 1999

WIPO PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts cre-3	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01908	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09/07/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 10/07/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N21/64		
Anmelder RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  03/02/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  09.09.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Thomte, M  Tel. Nr. +49 89 2399 2610 

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/01908

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-37                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-11                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,              Seiten:  
☐ Ansprüche,                Nr.:  
☐ Zeichnungen,            Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	10-11
	Nein: Ansprüche	1-9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

ad Abschnitt VIII

1. Die Ansprüche 1 und 3 wurden zwar als getrennte, unabhängige Ansprüche abgefaßt, sie scheinen sich aber tatsächlich auf ein und denselben Gegenstand zu beziehen und unterscheiden sich voneinander offensichtlich nur durch voneinander abweichende Definitionen des Gegenstandes, für den Schutz begehrt wird. Somit sind die Ansprüche nicht knapp gefaßt.  
Ferner mangelt es den Ansprüchen insgesamt an Klarheit, da es aufgrund der zwei unabhängigen Ansprüche schwierig ist, den Gegenstand des Schutzbegehrens zu ermitteln, und damit Dritten die Feststellung des Schutzzumfangs in unzumutbarer Weise erschwert wird. Aus diesem Grund erfüllen die Ansprüche 1 und 3 nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT. Weiterhin ist die Erfindung in den besagten Ansprüchen mittels sehr vielen Alternativen definiert (und/oder), was die Interpretation des beanspruchten Schutzzumfangs umständlich macht.
2. Aus der Beschreibung auf Seite 1 (siehe erster Absatz, Zeile 2), scheint es hervorzugehen, daß das Beleuchtungssystem wenigstens eine reelle und eine virtuelle Beleuchtungsquelle besitzen soll. Da die unabhängige Ansprüche 1 und 3 jedoch dieses Merkmal nicht enthalten (sondern beanspruchen entweder eine reelle oder eine virtuelle Quelle), entsprechen sie nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.
3. Der Verfahrensanspruch 11 ist unklar in dem er sich auf die Ansprüche 1 - 9 verweist welche zu einer anderen Kategorie gehören.

ad Abschnitt V

4. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:  
D1: WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY) 18. August 1994  
D2: EP-A-0 732 584



5. Dokument D1 beschreibt eine Wellenfeldmikroskope die die meisten der Merkmale des Anspruchs 3 aufweisen. Das Mikroskop des Dokuments D1 [siehe Figur 4 mit zugehörigem Text] offenbart ein Beleuchtungssystem, das eine Beleuchtungsquelle (20) und ein Objektiv (z.B. 19) umfaßt, die derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum (2), der Halte- und Manöviervorrichtung für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv (28), ein Okular (24) und einen Detektor (30) umfaßt. Weiter offenbart das Mikroskop, daß das Beleuchtung- bzw. Anregungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen eine reelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl aufweist, denen ein gemeinsames Objektiv (28) zugeordnet ist, in das die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquelle und des Strahlteilers derart einkoppelbar sind, daß sie auf der hinteren (dem Objektraum abgewandten) Fokalebene zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte aufweisen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen in variabel einstellbarem (mittels 26) Winkel zueinander verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren, und daß das Detektionssystem wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur umfaßt, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann, wobei dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor z.B. eine Kamera (30) vorgeordnet ist.

Anspruch 1 unterscheidet sich von dem aus D1 bekannten dadurch, daß dem das Detektionsobjektiv eine feststehende konfokale Detektionsringblende oder -lochblende oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

Diese Merkmale scheinen jedoch nur Möglichkeiten darzustellen, aus denen der Fachmann ohne erfinderisches Zutun, den Umständen entsprechend, auswählen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen. Anspruch 3 (sowie Anspruch 1 die sich auf ein ähnliches Gegenstand bezieht) erfüllen somit nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

6. Die abhängigen Ansprüche 2, 4 - 9 scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu offenbaren, die eine erfinderische Tätigkeit beinhalten, da sie sich entweder aus dem Gegenstand der Ansprüche 1 und 3 ergeben oder sich auf übliche Konstruktionsverfahren, die der Fachmann den Umständen entsprechend anwenden würde, beziehen.
7. Die Verfahrensansprüche 10 und 11 (wenn er sich auf Anspruch 10 bezieht) erfüllen die Erfordernisse zur Neuheit und erfinderischer Tätigkeit [Art 33(2),(3) PCT], da die Gesamtheit der Verfahrensschritte dieser Ansprüche weder aus dem Stand der Technik bekannt, noch nahegelegt ist.
8. Bei Weiterverfolgung der Anmeldung in der regionalen Phase wäre ein neuer Satz klar formulierter und gegenüber dem Stand der Technik (Dokument D1) abgegrenzter Patentansprüche einzureichen (siehe Absatz 9 unten) wobei die Erfindung mittels maximal einem einzigem unabhängigen Patentanspruch in jeder Kategorie definiert werden soll.

ad Abschnitt VII

9. Die unabhängigen Ansprüche sind nicht in der zweiteiligen Form nach Regel 6.3 b) PCT abgefaßt. Im vorliegenden Fall erscheint die Zweiteilung jedoch zweckmäßig. Folglich sollten die in Verbindung miteinander aus dem Stand der Technik bekannten Merkmale (Dokument D1 oder möglicherweise D2) in einem Oberbegriff zusammengefaßt (Regel 6.3 b) i) PCT) und die übrigen Merkmale in einem kennzeichnenden Teil aufgeführt werden (Regel 6.3 b) ii) PCT).
10. Ein Dokument, das den auf Seiten 1 - 2 beschriebenen Stand der Technik widerspiegelt, wurde in der Beschreibung nicht angegeben (Regel 5.1 a) ii) PCT).
11. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1 und D2 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben. [D2 scheint relevant zu sein im Hinblick auf das im Anspruch 10 beanspruchte Verfahren.]

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)  
12 March 1999 (12.03.99)

International application No.  
PCT/DE98/01908

Applicant's or agent's file reference  
cre-3

International filing date (day/month/year)  
09 July 1998 (09.07.98)

Priority date (day/month/year)  
10 July 1997 (10.07.97)

## Applicant

HAUSMANN, Michael et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
03 February 1999 (03.02.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Diana Nissen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

5<sup>RA</sup>

Applicant's or agent's file reference cre-3	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE98/01908	International filing date (day/month/year) 09 July 1998 (09.07.1998)	Priority date (day/month/year) 10 July 1997 (10.07.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 21/64		
Applicant RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 February 1999 (03.02.1999)	Date of completion of this report 09 September 1999, (09.09.1999,)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/01908

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-37, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-11, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 98/01908

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	10-11	YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Reference is made to the following documents:

D1 = WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY)  
August 18, 1994  
D2 = EP-A-0 732 584.

2. Document D1 describes a wave field microscope that has most of the features of Claim 3. The microscope in document D1 [see Figure 4 with associated text] discloses an illumination system that includes an illumination source (20) and an objective (e.g., (19)) that are disposed relative to each other in such a way that they are suitable for producing a standing wave field with an object space (2) having a holding and maneuvering device for an object, and with a detection system comprising an objective (28), an ocular (24), and a detector (30). The microscope further discloses: that the illumination and excitation system has a real illumination source for coherence-capable light beams in at least one of the three dimensions and at least one beam divider for coupling out at least one partial beam with which is associated a common objective (28) in which the light beams and light beam features of the

illumination source and of the beam divider can be so coupled that they have two focal points at a distance from each other on the rear (facing away from the object space) focal plane; that said light beams and light beam features converge in the space between the two focal planes at a variable, adjustable angle (by means of 26) and interfere to form a one-dimensional standing wave field; and that the detection system comprises at least one detection objective, preferably of high aperture number, suitable for epifluorescent detection or at least one detection objective suitable for rasterizing point detection. Said detection objective can also be identical with an objective of the excitation system, wherein a flat (two-dimensional) detector, e.g. such as a camera (30), is located in front of the detection objective suitable for epifluorescence.

Claim 1 differs from the disclosure in D1 in that a fixed confocal detection ring or apertured diaphragm or at least a fixed detection slit is placed before the detection objective and a point detector, in particular, a photomultiplier, a photodiode or a diode array is placed after said objective. These features, however, appear only to represent possibilities from which a person skilled in the art would choose, according to the circumstances, to solve the problem posed without thereby being inventive. Consequently, Claim 3 (and Claim 1, which refers to similar subject matter) does not satisfy the requirements of PCT Article 33(3).

3. Dependent Claims 2 and 4-9 do not appear to disclose any additional features that involve an inventive

step because they either derive from the subject matter of Claims 1 and 3 or concern conventional design processes that a person skilled in the art would apply according to the circumstances.

4. Process Claims 10 and 11 (if the latter refers to Claim 10) satisfy the requirements for novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3)) because the prior art neither discloses nor suggests the entirety of the process steps of these claims.
5. If the application is further prosecuted in the regional phase, a new set of clearly worded claims delimited over the prior art (document D1) should be submitted, the invention being defined by means of at most one independent patent claim in each category.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/DE 98/01908

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. The independent claims have not been drafted in two-part form, contrary to PCT Rule 6.3((b)). In the present case, however, the two-part form would be advantageous. Consequently, the features known in connection with each other from the prior art (document D1 or possibly D2) should be summarized in a preamble (PCT Rule 6.3(b)(i) and the remaining features included in a characterizing part (PCT Rule 6.3(b)(ii)).
2. A document that reflects the prior art described on pages 1-2 has not been included in the description (PCT Rule 5.1(a)(ii)).
3. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description neither mentions documents D1 and D2 nor the pertinent prior disclosed therein. [D2 appears to be relevant in view of the process claimed in Claim 10.]

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 98/01908

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1 and 3 are not drafted as separate, independent claims, however, they do in fact relate to one and the same subject matter and obviously differ from each other only by differing definitions of the subject matter for which protection is sought. Because of that, the claims are not concise. Furthermore, the claims as a whole are unclear because it is difficult to determine the subject matter for which protection is sought on the basis of two independent claims, so that determining the scope of the claim becomes unreasonably hard for a third party. For this reason, Claims 1 and 3 do not satisfy the requirements of PCT Article 6. Moreover, the invention in said claims is defined in terms of many alternatives (and/or), which makes interpretation of the scope of the claim unwieldy.
2. Page 1 of the description (see first paragraph, line 2) appears to indicate that the lighting system should have at least one real and one virtual light source. However, because independent Claims 1 and 3 do not contain this feature (but rather claim either a real or a virtual source) they do not satisfy the requirements of PCT Article 6 in conjunction with PCT Rule 6.3(b) that each independent claim must contain all of the technical features essential to the definition of the invention.
3. Process Claim 11 is unclear in that it refers to Claims 1-9, which belong to a different category.

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 21/64, G02B 21/06, C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/02974</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Januar 1999 (21.01.99)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01908 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Juli 1998 (09.07.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 29 512.6      10. Juli 1997 (10.07.97)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Seminarstrasse 2, D-69117 Heidelberg (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HAUSMANN, Michael [DE/DE]; Paul-Löbe-Strasse 4, D-67071 Ludwigshafen (DE). CREMER, Christoph [DE/DE]; Mombertplatz 23, D-69126 Heidelberg (DE). BRADL, Joachim [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 33, D-69198 Schriesheim (DE). SCHNEIDER, Bernhard [DE/DE]; Finkenweg 14, D-67346 Speyer (DE). <b>(74) Anwalt:</b> RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> WAVE FIELD MICROSCOPE, METHOD FOR A WAVE FIELD MICROSCOPE, INCLUDING FOR DNA SEQUENCING, AND CALIBRATION METHOD FOR WAVE FIELD MICROSCOPY  <b>(54) Bezeichnung:</b> WELLENFELDMIKROSKOP, WELLENFELDMIKROSKOPIEVERFAHREN, AUCH ZUR DNA-SEQUENZIERUNG, UND KALIBRIERVERFAHREN FÜR DIE WELLENFELDMIKROSKOPIE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to two new wave field microscopes (type I and type II) characterized in that they each have a stimulation and illumination system comprising at least one real and one virtual light source and at least one lens (in the case of type II) or two lenses (in the case of type I). The light sources and lens(es) are positioned in relation to each other in such a way that they are suitable for generating one, two or three-dimensional wave fields in the object space. The calibration method provided for in the invention has been adapted to these wave field microscopes and allows for geometrical distance measurements between fluorochrome-marked object structures the distance of which can be less than the half-intensity width of the principal maximum of the effective point image function. The invention also relates to a method for DNA sequencing by wave field microscopy.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft zwei neue Wellenfeldmikroskope Typ I und Typ II, die sich dadurch auszeichnen, daß sie jeweils ein Anregungs- und Beleuchtungssystem umfassen, das wenigstens eine reelle und eine virtuelle Beleuchtungsquelle und wenigstens ein Objektiv (im Fall von Typ II) bzw. zwei Objektive (im Fall von Typ I) umfaßt, wobei Beleuchtungsquellen und Objektiv (e) derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung von ein-, zwei-, und dreidimensionalen stehenden Wellenfeldern im Objektraum geeignet sind. Das erfindungsgemäße Kalibrierverfahren ist an diese Wellenfeldmikroskope angepaßt und erlaubt geometrische Distanzmessungen zwischen fluorochrommarkierten Objektstrukturen, deren Distanz geringer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion sein kann. Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur wellenfeldmikroskopischen DNA-Sequenzierung.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Wellenfeldmikroskop,  
Wellenfeldmikroskopieverfahren, auch zur DNA-Sequenzierung,  
und Kalibrierverfahren für die Wellenfeldmikroskopie**

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Wellenfeldmikroskop mit einem Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, das wenigstens eine reelle und eine virtuelle Beleuchtungsquelle und wenigstens ein Objektiv umfaßt, wobei Beleuchtungsquellen und Objektiv (e) derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines eindimensionalen stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum, der Halte und Manövrier Vorrichtung(en) für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv, ein Okular und einen Detektor umfaßt, sie betrifft außerdem ein daran angepaßtes Kalibrierverfahren für geometrische Distanzmessungen zwischen fluorochrommarkierten Objektstrukturen, deren Distanz geringer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion sein kann, und sie betrifft ein darauf aufbauendes Verfahren zur wellenfeldmikroskopischen DNA-Sequenzierung.

**Stand der Technik**

Durch den Einsatz hochspezifischer Marker, wie z.B. DNA-Proben oder Protein-Sonden, ist es möglich, in biologischen (Mikro-)Objekten, insbesondere in Zellen, Zellkernen, Zellorganellen oder auf Chromosomen, – im folgenden vereinfacht Objekt genannt –, nahezu beliebig kleine (Sub-)Strukturen zu markieren. Es können Strukturen in Dimensionen von einigen  $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}$  m) bis zu wenigen zehn nm ( $10^{-9}$  m) spezifisch dargestellt werden. Die Marker sind üblicherweise mit Fluorochromen oder auch kolloidalen Mikro(gold-)partikel gekoppelt, um ihre optische Detektion und Abbildung zu erleichtern bzw. überhaupt erst zu ermöglichen.

Um zwei Marker innerhalb desselben Objekts separat voreinander detektieren zu können, sind die betreffenden Marker häufig mit verschiedenfarbigen Fluorochromen gekoppelt. Das zur Verfügung stehende Farbemissionsspektrum der üblicherweise verwendeten

Fluorochrome reicht von tiefblau über grün, rot bis in den infraroten Spektralbereich. Es können aber auch Fluorochrome verwendet werden, die sich weder in ihrem Anregungsspektrum noch in ihrem Fluoreszenzspektrum unterscheiden, sondern bei denen die Lebensdauer ihrer Fluoreszenzemission als Parameter zur Unterscheidung genutzt wird. Letztere haben den Vorteil, daß wellenlängenabhängige fokale Shifts nicht auftreten. Fluorochrome können auch ein unterschiedliches Emissionsspektrum haben und damit verschiedene spektrale Signatur besitzen, aber mit derselben Photonenenergie anregbar sein, z.B. durch Mehrphotonenprozesse. Auch in diesem Fall können wellenlängenabhängige fokale Shifts in der Anregung zwischen Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur vermieden werden.

Die vorstehend genannten, an spezifische (Sub-)Strukturen in biologischen Mikroobjekten bindbaren bzw. gebundenen Fluorochrome werden im folgenden als Fluoreszenzmarker bezeichnet.

Stimmen Anregungsspektrum und/oder Emissionsspektrum und/oder die Fluoreszenzlebensdauern zweier Fluoreszenzmarker überein, so haben diese Fluoreszenzmarker hinsichtlich des betreffenden Parameters die gleiche spektrale Signatur. Unterscheiden sich die Fluoreszenzmarker in einem oder mehreren für die Messung relevanten Parametern, so haben sie unterschiedliche spektrale Signatur.

Unter Fluoreszenz wird im folgenden jede Photonenwechselwirkung verstanden, bei der zwischen dem Anregungsspektrum und dem Emissionsspektrum desselben Stoffes Unterschiede auftreten, die nicht auf monochromatische Absorption oder Streuung zurückgeführt werden können. Dies schließt insbesondere auch Mehrphotonenwechselwirkungen ein, bei denen die Anregungswellenlängen größer sein können als die Emissionswellenlängen.

Ferner wird hier der Begriff Fluoreszenz auch für die eng damit verwandten Phänomene der Lumineszenz, insbesondere die Phosphoreszenz verwendet. Dies schließt insbesondere längere mittlere Fluoreszenzlebensdauern ein, z.B. Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von bis zu mehreren oder vielen msec (Millisekunden). Im folgenden werden die

eng verwandten Vorgänge der Lumineszenz, Phosphoreszenz und Fluoreszenz als gleichermaßen erfindungsrelevant angesehen.

Die Detektion und Abbildung von Fluoreszenzmarker in ausgedehnten biologischen Objekten und die quantitative Lokalisation bezüglich definierter Objektpunkte /Objektstrukturen (Distanz- und Winkelmessungen) wird mit lichtmikroskopischen Meßverfahren durchgeführt. Hierbei spielt die sog. "Punktbildfunktion" (point spread function =PSF) oder "Punktantwort" des verwendeten Mikroskops oder allgemein des optischen Systems, d.h. dessen Fähigkeit, von einem "ideal punktförmigen" Objekt ein ebenso ideal punktförmiges Abbild zu erzeugen, eine entscheidende Rolle. Die Punktbildfunktion ist ein charakteristisches Merkmal einer jeden abbildenden Optik und ein Maß für deren Qualität.

Distanzmessungen zwischen Objektstrukturen hängen wesentlich von der effektiven — d.h. der lokal im markierten Objektpunkt gegebenen — Punktbildfunktion ab. Diese effektive Punktbildfunktion wiederum hängt stark von der jeweiligen lokalen Brechzahl und der Absorption im Objekt, im Einbettungsmedium des Objektes, in der Immersionsflüssigkeit und gegebenenfalls in den Deckgläsern ab.

Die effektive Punktbildfunktion unterscheidet sich im allgemeinen deutlich von der für das verwendete Mikroskop berechneten Punktbildfunktion. Auch die unter technisch optimierten Randbedingungen gemessenen Punktbildfunktionen unterscheiden sich in der Regel von den unter praktischen Routinelaborbedingungen in biologischen Objekten erzielbaren effektiven Punktbildfunktionen.

Da diese effektiven Punktbildfunktionen meist nicht zur Verfügung stehen, greift man zur Kalibrierung der Distanzmessungen auf ideale, berechnete Ergebnisse zurück bzw. auf Kalibrierungsmessungen, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurden, wie z.B. Reflexionsverfahren. Beide Verfahren gehen jedoch zu Lasten der Präzision bei der dreidimensionalen Distanzmessung in biologischen Mikroobjekten, und die Folge ist eine erhebliche Unsicherheit in der Bestimmung der tatsächlichen räumlichen Distanz zwischen den Objektstrukturen; bei biologischen Objekten beinhalten solche quantitativen Größenabschätzungen Unsicherheiten von bis zu mehreren Mikrometern.

Bis in die jüngste Zeit herrschte in der Fachwelt die praktisch einhellige Überzeugung, daß zwei Objektstrukturen nur dann separiert werden können, wenn sie mindestens eine Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion von einander entfernt sind.

Erst 1996 gelang es den Urhebern der vorliegenden Erfindung, ein Kalibrierverfahren für die Fernfeldmikroskopie (und auch die Flußfluorometrie) bereitzustellen, mit dem es möglich ist, Distanzmessungen zwischen Objektstrukturen, deren Abstand voneinander geringer ist als das Auflösungsvermögen des betreffenden Fernfeldmikroskops, d.h. die weniger als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion voneinander entfernt liegen, unabhängig von der Lage der betreffenden Objektstrukturen im dreidimensionalen Raum, mit hoher Genauigkeit durchzuführen.

Dieses Verfahren umfaßt die folgenden Schritte :

- Vor, während oder nach der Präparation des betreffenden Objekts auf bzw. in einem Objekthalter, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser/-kapillare oder Objektträgerflüssigkeit, werden die zu untersuchenden bzw. zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener und/oder gleicher spektraler Signatur markiert, d.h. solche zu ortende Strukturen (Meßstrukturen), die sich in unmittelbarer Nähe zueinander, nämlich innerhalb der Halbwertsbreite des Hauptmaximums ihrer effektiven Punktbildfunktion, befinden, werden mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener spektraler Signatur markiert, während solche Meßstrukturen, deren Abstand voneinander größer ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert werden. Zwei zu ortende Meßstrukturen dürfen immer dann mit der gleichen spektralen Signatur markiert sein, wenn sie z.B. durch ihre relative Lage oder durch andere Kriterien eindeutig identifiziert werden können.
- Mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen werden Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert,
- die fluoreszierenden Kalibriertargets werden entweder zusammen mit den Objekten oder separat auf bzw. in dem bzw. einem Objekthalter (Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser/-kapillare, Objektträgerflüssigkeit o.a.) präpariert.



- (Untersuchungs-)Objekt und Kalibriertargets werden unter übereinstimmenden Bedingungen, gleichzeitig oder nacheinander mikroskopisch oder flußfluorometrisch untersucht.
- Jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur werden unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems (Mikroskop oder Flußfluorometer) vermessen, die dabei ermittelten Meßwerte gleich Ist-Werte werden mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten gleich Soll-Werten (d.h. den aufgrund der Geometrie berechneten Soll-Lokalisationen) verglichen, und die Differenz zwischen Ist-Werten und Soll-Werten, nämlich der Kalibrierwert, wird zur Korrektur des durch das optische System bedingten Versatzes in der Detektion unterschiedlicher Emissionsloci insbesondere der Meßstrukturen verwendet.

Mit anderen Worten: Die Distanzmessung zwischen den (je nach Abstand voneinander) mit verschiedenen oder gleichen spektralen Signaturen markierten Objekt-(Sub-) Strukturen - im folgenden auch Meßstrukturen genannt - wird anhand der hochpräzisen Lokalisation unabhängiger (Kalibrier-)Targets mit entsprechend spektraler Signatur und mit bekannter Größe und räumlicher Anordnung, unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems durchgeführt, wobei die Kalibriermessung zwischen den (Kalibrier-) Targets und die Messung im biologischen Objekten unter gleichen System- und Randbedingungen stattfindet. Diese Kalibriertargets haben dieselbe oder eine höhere Multispektralität wie die zu messenden (Objekt-)Strukturen. Sie können direkt in den biologischen Objekten angeordnet sein, oder als separate Präparate auf einem Objekthalter (Objektträgerplättchen oder Objektträgerfaser/-kapillare oder Objektträgerflüssigkeit o.ä.) vorliegen oder Teil eines Objekthalters sein.

Zwei oder mehrere fluoreszierende Meßstrukturen in intakten, dreidimensionalen biologischen Objekten, deren Abstand und Ausdehnung kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion ist, können aufgrund ihrer unterschiedlichen spektralen Signatur (Fluoreszenzabsorptionswellenlängen und/oder Fluoreszenzemissionswellenlängen und/oder Fluoreszenzemissionslebensdauern) diskriminiert werden, d.h. ihr Abstand untereinander kann bestimmt werden.

Die Abstandsmessung wird auf die Lokalisation der einzelnen Meßstrukturen reduziert und kann — nun auch in der optischen Fernfeldmikroskopie oder Flußfluorometrie — mit einer wesentlich höheren Genauigkeit als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion durchgeführt werden. Die Lokalisation des Schwerpunkts der betreffenden Meßstrukturen wird auf die Maximalintensität ihres Fluoreszenzsignals angepaßt. D. h. aus dem gemessenen (beugungsbegrenzten) Signals (=Intensitätskurve) eines Fluoreszenzpunktes (=fluoreszierende Meßstruktur) wird — unter Berücksichtigung der Gesamtinformation aus Haupt- und Nebenmaxima — der Schwerpunkt (das Baryzentrum) des Signals bestimmt und damit der Ort der Meßstruktur. Bei fehlerfreiem optischen System und infolgedessen idealer Symmetrie der gemessenen Intensitätsverteilung (=Verlauf der Intensitätskurve) kolokalisiert der Schwerpunkt (das Baryzentrum) der Intensitätskurve innerhalb der Lokalisationsgenauigkeit mit dem Hauptmaximum (=Maximum 0. Ordnung des Beugungsbildes) der gemessenen Intensitätsverteilung. Dieses neue Kalibrierverfahren erlaubt es mittels optischer Fernfeld-Mikroskopie wie z.B. der Wellenfeldmikroskopie (oder auch mittels Scanning-Flußfluorometrie,) geometrische Distanzen in biologischen Mikro-Objekten zu messen, wobei die zu bestimmenden Distanzen geringer sein können als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion im Objekt. Da der Informationsgehalt der damit durchgeführten Distanzbestimmungen einer bei erhöhter Auflösung gewonnenen Distanzmessung entspricht, kann (und wird im folgenden) auch abkürzend von "Auflösungsäquivalent" gesprochen werden.

Die multispektrale Kalibrierung erlaubt es, in situ Messungen über das Abbildungsverhalten des Systems am konkreten biologischen Objekt durchzuführen. Bei Verwendung der Fluoreszenzlebensdauer als alleinigem Parametertyp und/oder bei Anregung der Fluorochrome mit derselben bzw. denselben Photonenenergie(n) entfällt aufgrund der Kalibrierung die in situ Korrektur des chromatischen Versatzes in der Objektebene. Für höchstauflösende Fernfeld-Mikroskoptypen wie z.B. das Wellenfeldmikroskop und bei Verwendung geeigneter Fluoreszenzmarker ermöglicht dieses Kalibrierverfahren dreidimensionale geometrische Distanzmessungen in biologischen Objekten bis hinunter zu molekularer Präzision (d.h. Auflösungsäquivalent besser 10 nm).

Zur Ermittlung von Ist- und Sollwerten, zu deren Vergleich und zur Bestimmung des Korrekturwerts/Kalibrierwerts werden vorzugsweise die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt:

- ein oder mehrere Kalibriertargets B mit einem Abstand größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion vom Schwerpunkt der N Meßstrukturen wird/werden mit einer beliebigen spektralen Signatur markiert,
- die Abstände  $d_{ik}$  ( $i, k = 1 \dots N, i \neq k$ ) der Schwerpunkte der spektral getrennten Beugungsfiguren der N Meßstrukturen und die Abstände  $d_{iB}$  der N Meßstrukturen zum Kalibriertarget B werden gemessen, wobei automatisierte Verfahren der Bildanalyse angewendet werden,
- für eine Meßstruktur werden die Strecken  $d_{ik}$  und  $d_{iB}$  jeweils in der Ebene der schmalsten Punktbildfunktion sowie alle übrigen Distanzen gemessen werden, wozu das Objekt axialtomographisch jeweils um einen definierten Winkel  $\phi_m$  gedreht wird,
- optische Aberrationen aus den Kalibrierungsmessungen werden korrigiert, und an die korrigierten gemessenen Abstände  $d_{ik}(\phi_m)$  und  $d_{iB}(\phi_m)$  wird jeweils eine Cosinusfunktion  $A_{ik} \cos(\phi_m + \theta_{ik})$  bzw.  $A_{iB} \cos(\phi_m + \theta_{iB})$  mit geeigneter Phasenverschiebung angepaßt,
- die Maxima  $A_{ik}$  und  $A_{iB}$  der Anpassungsfunktion von  $d_{ik}$  bzw.  $d_{iB}$  werden durch den Vergrößerungsfaktor dividiert und als euklidischer Abstand  $D_{ik}$  bzw.  $D_{iB}$  der N Meßstrukturen untereinander bzw. der Abstände der Meßstrukturen zum Bezugspunkt B bestimmt.

Für die Bestimmung der Maxima werden vorzugsweise zusätzlich die diesen entsprechenden Minima des Abstandes  $z_{ik}$ ,  $z_{iB}$  in der zu der Ebene der  $d_{ik}$ ,  $d_{iB}$  orthogonalen Ebene herangezogen und analog ausgewertet.

Die Ermittlung aller Koordinaten der N Meßstrukturen und ihrer Relativkoordinaten zum Bezugspunkt B, d.h. die Ermittlung der Positionen  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$  und  $x_k$ ,  $y_k$ ,  $z_k$  bzw. der Abstände  $x_k - x_i$ ,  $y_k - y_i$ ,  $z_k - z_i$  und  $x_B - x_i$ ,  $y_B - y_i$ ,  $z_B - z_i$ , erfolgt erfindungsgemäß auf der Grundlage der mikroskopisch gemessenen 3D-Abstände  $D_{ik}$  bzw.  $D_{iB}$ , vorzugsweise unter Verwednung des folgenden Gleichungssystems

$$D_{ik}^2 = (x_k - x_i)^2 + (y_k - y_i)^2 + (z_k - z_i)^2$$

$$D_{iB}^2 = (x_B - x_i)^2 + (y_B - y_i)^2 + (z_B - z_i)^2$$

$$D_{kB}^2 = (x_B - x_k)^2 + (y_B - y_k)^2 + (z_B - z_k)^2$$

Zur Absicherung der ermittelten Meßergebnisse sollte die vorstehend beschriebene Vorgehensweise für mehrere Kalibriertargets B und die gleichen N Meßstrukturen durchgeführt werden.

Die Koordinaten und Abstände der N Meßstrukturen können anhand der Schwerpunkte ermittelt werden, die sich aus Schwerpunktmittelungen der Messungen zu allen Bezugspunkten ergeben.

Insbesondere für graphische Darstellungen werden die ermittelten Positionen  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$  und  $x_B$ ,  $y_B$ ,  $z_B$  vorzugsweise mit einer Punktbildfunktion gefaltet, die eine Halbwertsbreite mit dem jeweils erreichten Auflösungsäquivalent besitzt.

Zur Fluorochrommarkierung von Meßstrukturen und Kalibriertargets werden vorzugsweise solche Fluorochrome verwendet, die im ultravioletten, sichtbaren und/oder infraroten Lichtwellenlängenbereich angeregt werden können und die im ultravioletten, sichtbaren und/oder infraroten Lichtwellenlängenbereich emittieren.

Als Kalibriertargets können entweder biologische Kalibriertargets oder nicht-biologische bzw. synthetische Kalibriertargets eingesetzt werden.

Bei den biologischen Kalibriertargets handelt es sich um markierte Regionen des biologischen Objekts mit bekannter Distanz voneinander. Die Markierung(en) der betreffenden Region(en) kann(können) beispielsweise mit geeigneten biochemischen Sonden durchgeführt werden. Die Verwendung solcher biologischer Kalibriertargets hat gegenüber der Verwendung synthetischer Kalibriertargets, beispielsweise Kalibrierkügelchen, den praktischen Vorteil, daß bei der Kalibrierung neben den optischen Randbedingungen des Objektes zusätzlich präparativ bedingte Randeffekte in die Kalibrierung einfließen, wie z.B. das Verhältnis aus tatsächlichem Fluoreszenzsignal zu unspezifischem Hintergrund (das durch automatische Bildanalysealgorithmen bestimmt wird).

Als nicht-biologische bzw. synthetische Kalibriertargets eignen sich ganz besonders Mikrokügelchen, die die gleiche oder eine höhere multispektrale Signatur als die zu ortenden Meßstrukturen aufweisen. Sie werden wie die biologischen Objekte behandelt. Solche Kalibriertargets sind vorzugsweise auf Objekthaltern in definierter Raumanordnung fixiert. Die Fixierung kann bereits bei der Fabrikation der betreffenden Objektträger geschehen, was insbesondere für die Routinebenutzung von Vorteil ist.

Zur Behebung des bei allen bekannten Fernfeldmikroskopieverfahren bestehenden Problems, daß die Breite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion und damit die Auflösungsgrenze von der relativen Lage im Raum abhängt, d.h. z.B. senkrecht zur optischen Achse (= lateral) schmaler ist als in Richtung der optischen Achse (= axial), kann das genannte Kalibrierverfahren sehr gut mit den im Stand der Technik bekannten sog. Mikroaxialtomographieverfahren kombiniert werden. Bei diesen Mikroaxialtomographieverfahren werden die (biologischen) Objekte in Kapillaren oder auf Glasfasern angeordnet und im bzw. unter dem Mikroskop definiert um eine Achse, die normalerweise senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops steht, gedreht werden, wobei Abstandsmessungen in derjenigen Richtung durchgeführt werden, die die schmalste Halbwertsbreite der effektiven Punktbildfunktion besitzt.

Ein Fernfeld-Lichtmikroskopieverfahren, das sich für die Detektion und Abbildung von insbesondere sehr kleinen, durch Fluoreszenzmarker kenntlich gemachte Substrukturen in biologischen Objekten besonders eignet, weil es gegenüber den bekannten Epifluoreszenzmikroskopieverfahren oder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie den Vorteil aufweist, daß es auch in axialer Richtung - senkrecht zu den Wellenfronten - eine Tiefendiskriminierung und damit wesentlich verbesserte Auflösung ermöglicht (ihre Dimension kann bei hoher Numerischer Apertur wesentlich geringer als die Wellenlänge des zur Anregung verwendeten Lichtes sein), ist das Wellenfeldmikroskopieverfahren.

Bei der Wellenfeldmikroskopie, wie sie z.B. in der US-Patentschrift 4,621,911 beschrieben ist, werden fluoreszierende bzw. lumineszierende Präparate im optischen Mikroskop mit einem stehenden Wellenfeld beleuchtet (Standing Wave Field Fluorescence Microscopy, SWFM). Ein stehendes Wellenfeld entsteht (nur) dort, wo Licht kohärenzfähig überlagert wird. Die Präparate werden in einer Zone äquidistanter ebener Wellenfronten angeordnet und zur Fluoreszenz oder Phosphoreszenz angeregt. Der Abstand der Wellenfronten und ihre Phase können (insbesondere zur Bilderzeugung) variiert werden. Aus einzelnen optischen Schnitten kann durch Computer-Bildverarbeitung die dreidimensionale Verteilung der fluoreszenten bzw. lumineszenten Objektpunkte rekonstruiert werden.

Die ebenen Wellenfronten sind senkrecht zur optischen Achse des detektierenden Objektives angeordnet und werden durch kohärente Überlagerung zweier Laserstrahlen unter einem definierten Winkel  $\theta$  zur optischen Achse des Mikroskopsystems erzeugt, wobei der Winkel  $\theta$  den Abstand der Wellenfronten untereinander bestimmt — bei gegebener Wellenlänge und Brechungsindex. An Stelle von zwei sich kreuzenden Laserstrahlen kann das Wellenfeld auch dadurch erzeugt werden, daß ein Laserstrahl nach geeigneter Reflexion unter einem bestimmten Winkel (z.B. mit einem Spiegel) mit sich selbst zur Interferenz gebracht wird. Die ebenen Wellenfronten zeichnen sich dadurch aus, daß der Intensitätsverlauf in Richtung senkrecht zu den Wellenfronten (co)sinusförmig ist.

Die Fluoreszenz bzw. Lumineszenz wird entweder durch entsprechende optische Filter spektral diskriminiert und in verschiedenen Strahlengängen geführt oder konfokal detektiert. Die erzielbare Auflösung, d.h. die kleinste noch meßbare Distanz zwischen zwei punktförmigen Objektstrukturen, die mit Fluorochromen gleicher spektraler Signatur markiert sind, ist entweder durch das Abbe-Kriterium (= das Maximum 0. Ordnung des Beugungsbildes eines Punktobjektes ist im 1. Minimum des Beugungsbildes eines zweiten Punktobjektes lokalisiert) oder durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion gegeben. Sie hängt von der jeweiligen Wellenlänge, der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, sowie von den lokalen Brechzahlen der Objekte, des Einbettungsmediums, der eventuell verwendeten Deckgläser und der eventuell eingesetzter Immersionsflüssigkeiten ab.

Die bekannten Wellenfeldmikroskope sind im Prinzip wie folgt aufgebaut: Sie umfassen

- (I) ein Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, bestehend aus  
wenigstens einer reellen und einer virtuellen Beleuchtungsquelle und wenigstens einem Objektiv, die derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines eindimensionalen, sinusförmigen, stehenden Wellenfeldes geeignet sind,
- (II) einen Objektraum, mit  
Halte und Manöviervorrichtungen für das Objekt, und
- (III) ein Detektionssystem, bestehend aus  
wenigstens einem Objektiv,  
wenigstens einem Okular

und wenigstens einem Detektor, wobei es sich häufig um eine Kamera, insbesondere eine CCD-Kamera handelt, die so positioniert ist, daß der CCD-Chip in der Zwischenbildebene liegt.

Ein Nachteil dieses Wellenfeldmikroskops nach dem Stand der Technik, im folgenden "eindimensionales Wellenfeldmikroskop" ("SWFM") genannt, bzw. der damit durchführbaren Wellenfeldmikroskopieverfahren besteht darin, daß das periodisch erzeugte Wellenfeld (bei epifluoreszenter Detektion in Verbindung mit Verfahren des Optical Sectioning) zu einer Mehrdeutigkeit in der Aufnahme bzw. Abbildung einer Objektstruktur führt, deren Ausdehnung in Richtung senkrecht zu den Wellenfronten wesentlich größer als  $\lambda/2n$  ist ( $\lambda$ =Wellenlänge der Anregung,  $n$ = effektiver Brechungsindex). Diese Mehrdeutigkeit erschwert zunächst eine effektive Nutzung der durch das Interferenzmuster erzielten Auflösungsverbesserung.

Zur Durchführung von Distanzmessungen und anderen Untersuchungen der räumlichen Verhältnisse von dreidimensionalen Objekten können die bekannten Fernfeldmikroskopieverfahren einschließlich der eindimensionalen Wellenfeldmikroskopie mit Axialtomographie kombiniert werden. Hierzu werden die zu untersuchenden biologischen Objekte, ggf. nach Ausrüstung mit Kalibriertargets, in oder auf einer Mikrokapillare oder Glasfaser als Objekthalter bzw. Objektträger präpariert. Die Kapillare/Faser hat einen exakt definierten Durchmesser, wobei verschiedene Durchmesser möglich sind. Zur Festlegung dieser Kapillare/Faser auf dem Mikroskoptisch dient eine spezielle Halterung vorgeschlagen, die aus einem starren, vorzugsweise dorsiventral abgeplatteten Rahmen besteht, an bzw. auf dem wenigstens eine Lagerbuchse montiert ist, in der eine Mikrokapillare oder Glasfaser um ihre Längsachse rotierfähig (vorzugsweise mit der Rotationsachse senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops) gelagert werden kann. (Die Lagerbuchse(n) sollten so angeordnet sein, daß die Rotationsachse der Kapillare/Faser senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops verläuft.) Die Drehung der Untersuchungsobjekte in oder an der Kapillare/Faser erfolgt durch Drehung der Kapillare/Faser direkt, vorzugsweise mittels eines Drehmotors.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Wellenfeldmikroskop der bekannten Art derart weiter zu bilden, daß es zur Erzeugung von ebenen Wellenfeldern in mehr als einer Dimension bei hoher Variabilität der Abstände der Interferenzmaxima geeignet ist, und das vorgenannte Kalibrierverfahren derart weiter zu entwickeln, daß es in Kombination mit einem solchen Wellenfeldmikroskop einsetzbar ist. Darüber hinaus soll ein Verfahren zur wellenfeldmikroskopischen DNA-Sequenzierung geschaffen werden.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht einerseits in der Bereitstellung der nachstehend beschriebenen sog. "mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskope", andererseits in der Bereitstellung des ebenfalls nachstehend beschriebenen, an die Anwendung eines mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops angepaßten Kalibrierverfahrens. Darüber hinaus wird ein Verfahren zur "Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung" bereit gestellt.

Bei dem einen erfindungsgemäßen "mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop" (Typ I) handelt es sich um ein Wellenfeldmikroskop der eingangs genannten Art, das durch die nachfolgend aufgelisteten Merkmale gekennzeichnet ist:

- (1) Das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem umfaßt in zwei oder allen drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Reflektor oder Strahlteiler zur Auskopplung von Teilstrahlen oder eine weitere Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen, denen jeweils wenigstens ein Objektiv zugeordnet ist, und die jeweils zur Erzeugung von Lichtwellenzügen geeignet sind, wobei die Lichtwellenzüge der einen Beleuchtungsquelle antiparallel oder in variabel einstellbaren Winkeln zu den Lichtwellenzügen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle ausgerichtet sind, und zwar derart, daß die von der einen Beleuchtungsquelle ausgesendeten Lichtwellenzüge mit denen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle zu einem stehenden Wellenfeld mit ebenen Wellenfronten interferieren.
- (2) Das Detektionssystem umfaßt wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur, welches mit seiner optischen



Achse senkrecht zu den Wellenfronten eines der interferierenden Wellenfelder angeordnet ist und welches mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann. Dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ist ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet, während dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

Unter "hoher" numerischer Apertur ist hier eine numerische Apertur  $\geq 1$  und unter "niedriger" numerischer Apertur eine numerische Apertur  $< 1$  zu verstehen.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Wellenfeldmikroskops (Typ I) ist in wenigstens einer Raumrichtung einem Objektiv hoher numerischer Apertur ein Objektiv niedriger numerischer Apertur oder ein Reflektor zugeordnet, und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) sind entweder zwei Objektive niedriger numerischer Apertur oder ein Objektiv niedriger numerischer Apertur und ein Reflektor einander zugeordnet.

Bei dem anderen erfindungsgemäßen "mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop" (Typ II) handelt es sich um ein Wellenfeldmikroskop der eingangs genannten Art, das durch die folgenden Merkmale charakterisiert ist.

- (1) Das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem umfaßt in wenigstens einer der drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl, denen ein gemeinsames Objektiv zugeordnet ist, in das die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquelle(n) und des/der Strahlteiler(s) derart eingekoppelt werden können, daß sie auf der hinteren (dem Objektraum abgewandten) Fokalebene zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte erzeugen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen in variabel einstellbarem Winkel zueinander verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren.

- (2) Das Detektionssystem umfaßt wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann. Dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ist ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet, während dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform dieses Wellenfeldmikroskops (Typ II) weist das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in derselben oder einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) jeweils wenigstens eine weitere reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und/oder wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl auf, dem/denen jeweils ein weiteres Objektiv zugeordnet ist, durch das der/die Lichtstrahlen (Lichtwellenzüge) in den Objektraum gelenkt und derart ausgerichtet sind, daß sie mit den Lichtstrahlen aus derselben oder aus der /den beiden anderen Raumrichtung(en) bzw. dem von diesen gebildeten ein- oder zweidimensionalen Wellenfeld zu einem zwei- bzw. dreidimensionalen Wellenfeld interferieren.

Eine weitere, sehr vorteilhafte Weiterbildung sämtlicher vorstehend genannten erfindungsgemäßen Wellenfeldmikroskope (Typ I und Typ II) zeichnet sich dadurch aus, daß der Objektraum eine Objekthalterung umfaßt, in bzw. an der das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder gegebenenfalls den/die Kalibriertarget(s) um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar in dem Wellenfeld gelagert ist, wobei für wenigstens eine Achse eine Drehbarkeit um 360-Grad ( $2\pi$ ) bevorzugt ist.

Mit diesen erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskopen Typ I und Typ II ist es möglich, eine zeitlich sequentielle und/oder simultane Detektion mehrerer Objektebenen durch eine, zwei und/oder drei Objektive (bzw. zu deren orthogonalen Achsen) durchzuführen. Präzisionsdistanzmessungen von Punktobjekten gleicher oder verschiedener spektraler Signatur, deren Abstände kleiner als die Halbwertsbreiten der Hauptmaxima der effektiven Punktbildfunktionen sind, können in (allen) Raumrichtungen vorgenommen werden.

Die feststehende(n) konfokale(n) Detektionsringblende(n), -lochblende und/oder der/die feststehende(n) Detektionsschlitz(e) in Kombination mit wenigstens einem geeigneten Lichtintensitätsdetektor bietet/bieten die vorteilhafte Möglichkeit, daß das Objekt in x-, y- und z-Richtung durch das Wellenfeld gerastert werden kann (Objekt- oder Stage-scanning).

Das erfindungsgemäße Wellenfeldmikroskop Typ II und die damit durchführbaren Wellenfeldmikroskopie hat — insbesondere gegenüber der bekannten eindimensionalen Wellenfeldmikroskopie — überdies den Vorteil, daß sowohl die laterale Auflösung (d.h. senkrecht zur optischen Achse) als auch die axiale Auflösung wesentlich verbessert ist. Es ist erstmals eine Diskriminierung von flächenhaften Objekten in axialer Richtung ohne den Einsatz von konfokalen Systemen möglich. Außerdem besteht die vorteilhafte Möglichkeit, daß man das Objekt während der Untersuchung bzw. zur Aufnahme / Datenregistrierung in lateraler Richtung verschieben kann. Mit Hilfe von Bildverarbeitungs- und Rekonstruktionsverfahren läßt sich dann aus den somit erhaltenen Mehrfachaufnahmen eine höhere laterale Auflösung gewinnen. Der erfindungsgemäße Aufbau Typ II mit einem Objektiv eignet sich außerdem auch zur Erzeugung eines eindimensionalen Wellenfeldes senkrecht zur optischen Achse eines Epifluoreszenzmikroskops und damit zur lateralen Auflösungsverbesserung desselben.

Bei einer weiteren Ausführungsvariante dieser "Mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskope" (Typ I und/oder Typ II) sind die das mehrdimensionale Wellenfeld erzeugende(n) Beleuchtungsquelle(n) und/oder der/die Reflektor(en) und/oder der/die Strahlteiler und/oder das/die Objektiv(e) und damit das mehrdimensionale Wellenfeld um

eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar angeordnet bzw. montiert.

Zur Abbildung der lateralen Objektbereiche eines im zwei- oder dreidimensionalen Wellenfeld feststehenden Objekts auf die Detektorringblende, -lochblende bzw. den Detektorschlitze kann jedes erfindungsgemäße Wellenfeldmikroskop (Typ I und/oder Typ II) mit einem Scannerspiegel ausgerüstet sein, der derart angeordnet ist, daß er die betreffenden lateralen Objektbereiche mit der gewünschten, meist maximalen, Fluoreszenzintensität abbildet.

Bei einer besonders vorteilhaften Weiterbildung der erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskope (Typ I und/oder Typ II), die für Zwei- oder Mehr-Photonen-Fluoreszenzanregungen geeignet ist, den sog. "Wellenfeldmikroskopen mit kombinierter Mehr-Photonen-Fluoreszenzanregung", umfaßt das jeweilige Beleuchtungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen eine reelle Beleuchtungsquellen für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) eine reelle und/oder virtuelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung. Die damit erzeugten stehenden Wellenfelder ( $WF_1, WF_2, \dots, WF_i$ ) weisen voneinander verschiedene Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$ ) auf, und die Distanzen ( $d_1, d_2, \dots, d_i$ ) zwischen ihren jeweiligen Wellenmaxima bzw. Wellenminima betragen  $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos\theta_1$  bzw.  $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos\theta_2$  bzw.  $d_i = \lambda_i / 2n \cos\theta_i$  (mit:  $n$  = Brechungsindex im Objektraum,  $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_i$  = Kreuzungswinkel des Lichtwellenzugs der Wellenlänge  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$  mit der optischen Achse). Diese Wellenfelder  $WF_1, WF_2, \dots, W_i$  sind erfindungsgemäß derart zueinander ausgerichtet, daß sich mindestens ein Maximum zweier oder aller stehenden Wellen an derselben Stelle, nämlich dem Ort einer Mehrphotonenanregung, befindet.

Geeignete Beleuchtungsquellen für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung sind im Stand der Technik bekannt und z.B. in der Druckschrift von W.Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", Science, Vol. 248, pp.73-76 (6. April 1990) beschrieben, auf deren Inhalt hier ausdrücklich Bezug genom-

men wird. Diese Beleuchtungsquellen produzieren entweder Photonen unterschiedlicher Wellenlängen oder kohärente Photonen gleicher Wellenlänge.

Ein besonderer Vorteil der Kombination aus Ein- und Zwei- oder Mehrphotonenanregung besteht in der gleichzeitigen Anregung von Fluoreszenzmarkern verschiedener spektraler Signatur. Hierdurch können Fehler der Distanzmessung aufgrund der chromatischen Aberration im Objekt eliminiert werden. Bei der Zwei-Photonen-Anregung wird ein Fluorochrommolekül dann angeregt, wenn zwei Photonen simultan die Energie für die Anregung eines Moleküls liefern. Dabei können die zwei an der Anregung des Moleküls beteiligten Photonen dieselbe oder unterschiedliche Wellenlängen bzw. Energieen besitzen. Für eine koinzidente Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2$ ) müssen bei der sog. "Zwei-Photonen-Wellenfeldmikroskopie" in jeder jeweiligen Raumrichtung jeweils zwei Wellenfelder mit den Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  installiert sein. Die Wellenmaxima bzw. Wellenminima der beiden stehenden Wellenfelder (WF1, WF2) haben dabei die Distanzen  $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos\theta_1$  bzw.  $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos\theta_2$  (wobei gilt:  $n$  = Brechungsindex im Objektraum,  $\theta_1, \theta_2$  = Kreuzungswinkel des Laserstrahls der Wellenlänge  $\lambda_1, \lambda_2$  mit der optischen Achse). Da im allgemeinen die Distanzen  $d_1$  und  $d_2$  verschieden sind, werden die beiden Wellenfelder pro Raumrichtung so ausgerichtet, daß ein Hauptmaximum beider stehender Wellen sich an derselben Stelle befindet. Mehrphotonen-Effekte können dann nur dort auftreten, wo beide Wellenfelder sich überlagern. Damit werden nur noch einzelne "Streifen" des Wellenfeldes einer Raumrichtung zur Mehrphotonenanregung genutzt. Vieldeutigkeiten bei Objekten der Dimension größer  $d$  treten erst bei Dimensionen mit der Bedingung  $k_1 d_1 = k_2 d_2$  ( $k_1, k_2$  sind ganze Zahlen) auf. Durch eine Mehrphotonenanregung der fluoreszenzmarkierten Meßstrukturen und Kalibrier targets wird somit eine Eindeutigkeit der dreidimensionalen Abbildung erreicht. Die Verwendung von Zwei- oder Mehrphotonenfluoreszenzanregungsverfahren ermöglicht ein schnelleres Abscannen bzw. Abrastern des Objekts, d.h. der Objektpunkte, -linien und -ebenen und damit eine bessere Abbildungsqualität insbesondere auch bei sich bewegenden Objekten.

Eine ebenfalls sehr vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops zeichnet sich dadurch aus, daß eine Anordnung aus Lichtquelle, Objektiv und einem elektrisch leitenden Spiegel, die zur Erzeugung eines eindimensionalen, elektrischen Wellenfeldes geeignet ist, relativ zur Objektträgerhalterung vorgesehen ist, und zwar derart, daß die in dem Objekt befindlichen Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets im Bedarfsfall (z.B. wenn sich diese an bzw. in Molekülketten befinden) durch Anlegen des elektrischen Feldes — vor oder während des mikroskopischen Meßvorgangs — ausgerichtet werden können. (Die auf diese Weise räumlich ausgerichteten Molekülketten können dann anschließend noch mit immobilisierenden Substanzen fixiert werden.) Diese Variante des erfindungsgemäßen Wellenfeldmikroskops ist vor allem für die wellenmikroskopische DNA-Sequenzierung geeignet, wobei das eindimensionale elektrische Wellenfeld zur Kalibrierung bei der DNA-Sequenzierung dient.

Zur Detektion des Lumineszenzlichtes wird vorzugsweise eine CCD-Kamera(s) in bekannter Weise eingesetzt. Diese kann hinter der Detektorringblende oder -lochblende oder dem Detektorschlitze sitzen. Anstelle der CCD-Kamera bzw. des CCD-Chips kann das erfindungsgemäße mehrdimensionale Wellenfeldmikroskop aber auch mit einer elektronischen Bildaufnahmeverrichtung ausgerüstet sein, wie sie beispielsweise von Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopen (CLSM) im Stand der Technik bekannt ist. Erfindungsgemäß kann prinzipiell jedes lichtempfindliche Detektionsgerät, insbesondere Photodiode(n), Photomultiplier, CCD-Kameras/-Chips, CCD-Arrays, Avalanche Dioden, (Avalanche) Dioden Arrays, zweidimensionale (Avalanche) Dioden Matrizen hinter der hinter der Detektorringblende oder -lochblende oder dem Detektorschlitze angeordnet sein, um die Fluoreszenz zu detektieren und zu dokumentieren, wobei auch Fluoreszenzlebensdauermessungen vorgenommen werden können.

Bei dem erfindungsgemäßen Kalibrierverfahren handelt es sich um ein Kalibrierverfahren der vorstehend genannten Art, das durch die folgenden Maßnahmen gekennzeichnet ist:

- (1) Das biologische Objekt mit den fluorochrommarkierten Meßstrukturen und/oder den/die fluorochrommarkierten Kalibriertargets wird sequentiell oder simultan mit

einzelnen (separaten), in zwei oder drei Raumrichtungen orthogonal zueinander verlaufenden, stehenden und zu einem zwei- oder dreidimensionalen Wellenfeld miteinander interferierenden Wellenfeldern beleuchtet, wobei die Fluorochrome zur Fluoreszenzemission angeregt werden.

- (2) Zur Detektion der Fluoreszenzintensität wird/werden eine Kamera und/oder eine oder mehrere zweidimensionale Anordnung(en) aus Einzeldetektoren mit jeweils kreis-, ring- oder schlitzförmiger Blende oder eine Anordnung von mehreren kreis-, ring- oder schlitzförmigen Blenden verwendet
- (3) Entweder das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder die/den Kalibriertargets oder das ein- bzw. zweidimensionale Wellenfeld oder beides wird während des Meßvorgangs schrittweise um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen gedreht, wobei die fluorchrommarkierten Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets sequentiell oder simultan mit einem oder zwei einzelnen, orthogonal zueinander stehenden Wellenfeldern beleuchtet werden.

Bei der simultanen Beleuchtung wird das Mikroobjekt mit den Meßstrukturen und den bzw. die Kalibriertargets starr oder um eine Achse drehbar gelagert. Zwei oder drei orthogonal zueinander verlaufende, stehende, ebene Wellenfelder werden zur Interferenz gebracht und beleuchten das Mikroobjekt simultan. Bei zwei Wellenfeldern entstehen Ebenen mit einem zweidimensionalen symmetrischen Gitter aus Punkten maximaler und minimaler Intensität. Bei der Verwendung von drei Wellenfeldern entsteht ein dreidimensionales Raumgitter aus symmetrisch regelmäßig angeordneten Punkten maximaler und minimaler Intensität. Zwischen den Intensitätsmaxima und -minima liegt ein kontinuierlicher Intensitätsverlauf vor.

Bei der sequentiellen Beleuchtung wird das Mikroobjekt im Wellenfeld um zwei Achsen gedreht. Während oder nach der Detektion kann die Lage des Wellenfeldes relativ zum Objekt verändert werden.

Bei Verwendung geeigneter Fluoreszenzmarker erlaubt die Erfindung somit, dreidimensionale (3D), geometrische Distanzmessungen zwischen Fluoreszenztargets gleicher bzw. verschiedener spektraler Signatur mit molekularer Präzision, d.h. mit einem 3D Auflösungsäquivalent bis zu besser als 10 nm und mit einer 3D Lokalisationsgenauigkeit bis zu besser als 1 nm. Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie bzw. zur optischen und nicht-

optischen Nahfeldmikroskopie bleibt die dreidimensionale Struktur des zu untersuchenden Objektes intakt, da auf mechanische Schnitte verzichtet wird. Damit können in dreidimensional konservierten Mikroobjekten 3D-Distanzmessungen in einem Bereich kleiner als die Halbwertsbreite der Hauptmaxima der effektiven Punktbildfunktionen vorgenommen werden. Insbesondere eröffnet das Verfahren die Möglichkeit, dreidimensionale Distanzmessungen auch unter vitalen Bedingungen des biologischen Objektes durchzuführen. Bei der DNA-Sequenzierung kann die Herstellung von Gelen und die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Stücke entfallen. Ebenso kann auf eine Autoradiographie verzichtet werden, da keine radioaktive Markierung durchgeführt wird. Und auch lange DNA-Sequenzen (z.B. > 1 kbp) können ohne weiteres analysiert werden.

Diese erfindungsgemäße Verfahrensvariante erlaubt außerdem eine wesentlich verbesserte Bestimmung auch morphologischer Größen (z.B. Volumen, Oberflächen), sofern die multispektralen Fluoreszenzmarker in geeigneter Weise z.B. auf der Oberfläche des Objektes, verteilt werden. Beispielsweise kann auf diese Weise das Volumen eines sphärischen Mikroobjektes mit einem Radius von einigen 100 nm erheblich besser bestimmt werden als das mit herkömmlichen mit morphologischen Segmentierungstechniken, wie z.B. Cavalieri- und Voronoi Verfahren, oder auch Methoden des Volumenkonservierenden Gradual Thresholding möglich ist.

Mit dem bzw. den erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskopen (Typ I und/oder Typ II) und dem erfindungsgemäßen Kalibrierverfahren ist es möglich eine mikroskopische DNA-Sequenzierung durchzuführen. Hierfür wird erfindungsgemäß das nachfolgen beschriebene "Wellenfeldmikroskopieverfahren zur DNA-Sequenzierung" vorgeschlagen:

- (1) Es werden alle komplementären Subsequenzen der zu analysierenden DNA-Sequenz derart hergestellt, daß alle Subsequenzen am selben Nukleotid der zu analysierenden Sequenz beginnen.
- (2) Die zu analysierenden Bruchstücke werden alle am 3'-Ende mit einem Bezugsfluorochrommarker  $\alpha$  und am 5'-Ende und/oder an definierten Zwischenstellen mit einem Fluorochrommarker a, g, c, oder t — je nachdem ob das Nukleotid die Base Adenin



- (Marker a), Guanin (Marker g), Cytosin (Marker c) oder Thymin (Marker t) trägt — markiert, wobei die Fluorochrommarker a, g, c, t und  $\alpha$  verschiedene spektrale Signatur aufweisen, und jeweils ein oder mehrere Fluorochrommoleküle enthalten.
- (3) Die markierten DNA-Subsequenzen werden derart auf Träger fixiert, daß sie als lineare Sequenz vorliegen, und in ein ein- oder mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop eingebracht.
  - (4) Die linearen DNA-Subsequenzen werden so zu den stehenden Wellenfronten orientiert, daß eine exakte Abstandsmessung (Genauigkeit  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) zwischen  $\alpha$  und a bzw. g, c oder t — nach Bestimmung der Intensitätsbaryzentren und Kalibrierung der Abbildungseigenschaften — durchgeführt werden kann, indem
  - (5) die Signale der Fluorochrommarker schrittweise, spektral getrennt voneinander registriert werden, und
  - (6) aus den Abständen der fluoreszenten Markern und ihrer spektralen Signatur die DNA-Basensequenz des zu analysierenden DNA-Stückes bestimmt wird.

Mit diesem im Stand der Technik völlig neuartigen Verfahren können DNA-Fragmente in ihrer Länge nukleotidgenau vermessen werden, und auch ihre Basensequenz kann exakt bestimmt werden. Gelelektrophorese und nachfolgende Bandenauswertung kann entfallen.

#### **Ausführungs- und Vergleichsbeispiele zur näheren Erläuterung der Erfindung :**

##### **BEISPIEL 1: Aufbau eines mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops Typ I mit drehbar gelagertem Objekt**

Die Basis stellt ein herkömmliches "eindimensionales" Wellenfeldmikroskop dar, das z.B. mit zwei sich gegenüber liegenden Objektiven hoher Numerischer Apertur oder mit einem Objektiv hoher gegenüber einem Objektiv niedriger numerischer Apertur oder mit einem Objektiv für zwei interferierende Laserstrahlen aufgebaut wird. Durch die Objektive werden zwei Teilstrahlen eines Lasers so zur Interferenz gebracht, daß ein eindimen-

sionales stehendes Wellenfeld entsteht. Über ein oder zwei Objektiv(e) hoher Numerischer Apertur wird die Fluoreszenz detektiert. Jeweils in einer oder in beiden orthogonalen Richtungen zur optischen Achse des Detektionsobjektivs werden jeweils zwei weitere Teilstrahlen des Lasers über Objektive niedrigerer Numerischer Apertur und/oder Fokussierlinsensysteme in geeignetem Abstand eingekoppelt und so miteinander und mit dem eindimensionalen stehenden Wellenfeld zur Interferenz gebracht, daß ein zwei- oder dreidimensionales symmetrisches Intensitätsmuster aus Intensitätsmaxima und -minima entsteht.

In dieses "mehrdimensionale" Wellenfeldmikroskop wird zur Objektlagerung ein Mikroaxialtomograph eingebaut.

Bei der Axialtomographie wird anstelle des Glas-Objektträgers eine Mikrokapillare oder eine Glasfasern eingesetzt, die drehbar gelagert ist und das (biologische) Objekt in sich aufnimmt (Kapillare) oder an dem das (biologische) Objekt geeignet aufgebracht ist (Kapillare/Faser). Manuell oder mit einem computergesteuerten Schrittmotor kann die Kapillare/Faser, die üblicherweise senkrecht zur optischen Achse des Detektionsobjektivs angeordnet wird, um die Faserachse um einen definierten Winkel gedreht werden. Eine Drehung um einen Winkel von 360 Grad ( $2\pi$ ) ist möglich. Der Trägerhalter für die Kapillare/Faser ist auf einem Halbkreis drehbar gelagert. Die Drehachse verläuft dabei senkrecht zur optischen Achse des Detektionsobjektivs.

Die Detektion der räumlichen Anordnung der Mikrotargets und ihrer Distanz erfolgt mittels des erfindungsgemäßen Kalibrierverfahrens und digitaler Bildanalyse. Mehrdeutigkeiten von Intensitätsverläufen, d.h. z.B. Intensitätshaupt- und -nebenmaxima von fluoreszenten "Punkt"-targets, können mit Hilfe geeigneter Computeralgorithmen statistisch ausgewertet werden und damit zu einer Erhöhung der Lokalisationspräzision beitragen. Bei ausgedehnten Objekten können Mehrdeutigkeiten durch Zwei- oder Mehr-Photonen Anregung mit Photonen verschiedener Wellenlänge reduziert werden.

**BEISPIEL 2: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Chromosomen in einem Zellkern mittels mehrdimensionaler Wellenfeldmikroskopie, erfindungsgemäßem Kalibrierverfahren und ggf. Axialtomographie**

(I) In einem Zellkern nimmt das Chromatin der einzelnen Chromosomen definierte Teilregionen ein. Innerhalb einer oder mehrerer solcher chromosomalen Teilregionen werden die zu ortenden Strukturen, d.h. die Meßstrukturen, z.B. kleine Chromosomenabschnitte wie Gene oder Teilstücke von Genen, mit einer im Stand der Technik bekannten Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung spezifisch markiert, und zwar mit Fluorochromen verschiedener bestimmter spektraler Signaturen  $M_1, M_2, M_3, \dots$ . Die Abstände zwischen den Markierungsorten (den markierten Meßstrukturen) liegen unter der klassischen Auflösung, d.h. sie sind kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion. Die Markierung der (Objekt-) Strukturen (Meßstrukturen) erfolgt derart, daß die spektralen Signaturen an den zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) mit nahezu der gleichen Dynamik vertreten sind.

Das biologische Objekt wird auf einer Glasfaser exakt definierten Durchmessers oder in einer runden oder rechteckigen Kapillare definierter Dimensionen präpariert.

(II) Um die Distanzen zu bestimmen, werden mikroskopierbare Präparate mit Kalibriertargets hergestellt, und zwar unter den gleichen physikalischen und chemischen Versuchsbedingungen wie das Objekt bzw. die zu ortenden Objektstrukturen (= Meßstrukturen).

Als Kalibriertargets bzw. als Präparate mit Kalibriertargets dienen beispielsweise:

**a) mikroinjizierbare Kügelchen einer spektralen Signatur (monochromatisch):**

Die Kügelchen sind nach bekannten Verfahren mit jeweils einem Fluorochrom, d.h. monochromatisch markiert und aufgrund ihrer Größe von den auszumessenden (zu ortenden) Strukturen im Objekt (den Meßstrukturen) unterscheidbar. Man injiziert solche Kalibrierkügelchen, die die im Objekt vorhandenen spektralen Signaturen der Meßstrukturen repräsentieren, ansonsten aber vorzugsweise identisch sind (hinsichtlich Größe, Geometrie, Materialbeschaffenheit etc.). Mit anderen Worten: Die spektralen Signaturen

der Meßstrukturen sowie der Kalibriertargets werden so gewählt, daß unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen die von ihnen emittierten Fluoreszenzemissionen getrennt voneinander analysiert werden können. Die Injizierung und Fixierung der monochromatischen Kalibrierkügelchen erfolgt derart, daß sich die einzelnen Kügelchen verschiedener spektraler Signatur in Clustern direkt an der Glasfaser-Oberfläche oder Kapillarwand anordnen, vorzugsweise in einer Querschnittsebene der Faser bzw. Kapillare. Bei Verwendung von Präzisionsfasern und/oder -kapillaren liegen die Kügelchen folglich in definierten Abständen voneinander bzw. von einer Bezugsebene, Bezugsachse oder Bezugslinie.

b) mikroinjizierbare Testkügelchen multispektraler Signatur (polychromatisch) und gleicher spektraler Dynamik:

Die Kügelchen sind nach bekannten Verfahren mit jeweils allen bei den markierten (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) vorkommenden spektralen Signaturen markiert. Infolgedessen können sie an beliebige Stellen im zu vermessenden biologischen Objekt (hier Kern) injiziert werden. Eine Sollgeometrie wie bei a) ist nicht erforderlich, da für jede Signatur die chromatischen Schwerpunkte an derselben Stelle lokalisiert sein sollen. Zur Unterscheidung von den markierten (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) können die Kügelchen entweder einer anderen Größenklasse angehören oder aber eine zusätzliche spektrale Signatur tragen, die bei den zu messenden Strukturen d.h. den Meßstrukturen (gemäß Präparationsprotokoll) nicht vorkommt.

c) simultan markierte Chromosomenregionen bekannter Distanz an einem anderen Chromosom als demjenigen, das die zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) trägt:

Die Kalibriertargets, d.h. hier die Chromosomenregionen mit bekanntem Abstand voneinander, sind mit Hilfe einer Probenkombination von DNA-Sequenzen, die die verschiedenen spektralen Signaturen trägt, unterschiedlich markiert. Eine Unterscheidung der chromosomalen Kalibriertargets von den zu ortenden (Chromosomen-) Strukturen (Meßstrukturen) kann beispielsweise durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität erfolgen oder durch ein unterschiedliches Intensitätsverhältnis zwischen Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur oder durch Verwendung eines zusätzlichen Fluorochroms

mit abweichender spektraler Signatur, das bei der Fluoreszenzmarkierung der Meßtargets nicht verwendet wurde.

Es ist auch möglich, daß die Kalibriertargets einer anderen Größenklasse angehören als die zur ortenden Meßstrukturen.

(III) Die Distanzmessungen werden mit einem erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop, kombiniert mit Photomultiplier und/oder Kamera und Datenverarbeitungsanlage, durchgeführt. Von dem biologische Mikroobjekt, hier im Beispiel einem Zellkern, wird eine Serie optischer Schnitte aufgenommen. Die Meßstrukturen  $M_1, M_2, M_3, \dots, M_L$  besitzen  $l = 1, 2, \dots, L$  spektrale Signaturen. Die spektrale Signatur der Kalibriertargets  $U_1, U_2, U_3, \dots, U_L$  unterscheiden sich von derjenigen der Meßstrukturen z.B. in Volumen, Durchmesser, Intensität oder in der Zahl der spektralen Signaturen ( $l = 1, 2, \dots, L+1$ ). Die Bilder der optischen Schnitte werden für jede spektrale Signatur getrennt aufgenommen und gegebenenfalls noch der Untergrund korrigiert. Zur Auswertung werden zum einen die Kalibriertargets identifiziert und der chromatische Versatz bestimmt. Dazu werden die Kalibriertargets unter jeder spektralen Signatur lokalisiert und die Abstände zwischen den Kalibriertargets mit Fluorochrommarkierungen verschiedener spektraler Signatur gemessen. Die gemessenen Lokalisationen (d.h. die gemessenen Targetabstände) werden mit den aufgrund der Geometrie berechneten Soll-Lokalisationen (d.h. den tatsächlichen Targetabständen) verglichen und daraus der spektral bedingte Versatz (Shift) bestimmt.

Dieser Versatz (Shift) ist der Kalibrierwert für die gemessenen Distanzwerte zwischen den zu ortenden (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen).

Da dieser Versatz von den optischen Eigenschaften des Präparates abhängt (z.B. Brechzahlen in den Kernen und dem Präparationsmedium), sollte die Kalibrierung in situ erfolgen. Das heißt im vorliegenden Beispiel, daß sich die Kalibriertargets neben den zu untersuchenden und markierten (chromosomalen) Strukturen (Meßstrukturen) im Kern befinden sollten.

Zum anderen werden die Abstände zwischen den zu ortenden (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) lokalisiert. Man bestimmt dabei in jeder spektralen Signatur zunächst unabhängig voneinander die Position der Schwerpunkte der gemessenen Intensitätssigna-

le, d.h. es werden die Abstände zwischen den verschiedenen Farbsignalen bzw. Farbpunkten der betreffenden Meßstrukturen, z.B. zwischen dem rotfluoreszierenden und dem grünfluoreszierenden Farbpunkt (von Intensitätsmaximum zu Intensitätsmaximum oder von Schwerpunkt/Baryzentrum zu Schwerpunkt/Baryzentrum) gemessen, und dieser Meßwert wird um den mit den Kalibriertargets ermittelten (durch die verschiedene spektrale Signatur bedingten) Versatz in hochpräziser Weise korrigiert.

Die korrigierten Positionen der Meßstrukturen werden in Bezug auf einen Vergleichspunkt angegeben. Dieser Vergleichspunkt kann z.B. ein beliebig ausgezeichnete fester Punkt im Objekt oder der Schwerpunkt eines Kalibriertargets (z.B. eine markierte Chromosomenregionen) oder eines sonstwie ausgezeichneten Chromosomenterritoriums sein. Es kann aber auch die Schwerpunktskoordinate aller Meßstrukturen innerhalb eines Chromosomenterritoriums sein.

Bei Kalibriertargets in Gestalt von mikroinjizierbaren Testkügelchen mit multispektraler Signatur (polychromatisch) wird der chromatische Versatz aus dem Lokalisationsunterschied der Schwerpunkte für jede Signatur bestimmt. Die dafür erforderliche Identifizierung der zu einem Kalibriertarget gehörenden Fluoreszenzemission kann beispielsweise durch volumenerhaltende Schwellwertverfahren oder durch Mittelung der Segmentierungsergebnisse bei Schwellwertvariation erfolgen.

Bei Kalibriertargets in Gestalt von fluorochrommarkierten Objektregionen mit multispektraler Signatur (polychromatisch) wird der chromatische Versatz genauso bestimmt.

Als fluorochrommarkierte Kalibrierregionen eignen sich insbesondere auch Zentromerregionen, die mit einer Probenkombination von solchen DNA-Sequenzen hybridisiert werden, die alle an dieselben chromosomalen DNA-Abschnitte binden, jedoch mit Fluorochromen unterschiedlichen spektraler Signatur markiert wird. Erfolgt die Hybridisierung unter hoch stringenten Bedingungen, liegen pro Zellkern zwei Markierungsregionen vor; bei nieder-stringenten Bedingungen werden aufgrund zusätzlicher Nebenbindungsregionen zusätzliche Zentromerregionen markiert, so daß die Zahl der Kalibrierungsregionen ansteigt. Das ist u.U. sehr von Vorteil.

(IV) Die beschriebenen Meßverfahren können auch in Kombination mit Axialtomographie durchgeführt werden. Hierfür wird das biologische Mikroobjekt, z.B. ein Zellkern, in dem die zu ortenden Meßstrukturen bereits mit Fluorochromen markiert sind und das auch bereits Kalibriertargets enthält (zur Präparation siehe Beispiel 1), auf einer Glasfaser oder in der Mikrokapillare angeordnet. Mit dem Axialtomograph wird das Objekt Schritt für Schritt um einen definierten Winkel gedreht unter ggf. automatischer Refokussierung. Von jedem Winkelschritt wird ein kompletter 2D oder 3D-Bildstapel aufgenommen.

Die Drehung erfolgt in der Art, daß jeweils ein Abstand zwischen zwei Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets (d.h. zwischen deren Fluoreszenzintensitätsschwerpunkten) maximal wird. Der maximale gemessene Abstand entspricht dem tatsächlichen Abstand.

Ist man nur an den Abständen zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets, d.h. nicht an ihrer absoluten räumlichen Anordnung interessiert, kann man nun von einer der bekannten Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets aus fortfahren, den Abstand zu einer dritten Meßstruktur bzw. einem dritten Kalibriertarget zu maximieren und zu bestimmen. Sind die Abstände zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion, so genügt eine einzige spektrale Signatur; sind die Abstände dagegen kleiner, müssen die Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets durch multispektrale Signatur unterschieden werden. Die Schwerpunkte (Maxima) der Signale dienen der Lokalisierung. Sofern die untersuchten Meßstrukturen einen Durchmesser haben, der kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion ist, werden alle Beugungsbilder der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets durch eine scharfe Punktbildfunktion bestimmt, so daß die Maxima optimal bestimmt werden können.

Ist man an der absoluten Anordnung der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets im Raum interessiert, so müssen die jeweiligen Schwerpunkte (sog. "Baryzentren") präzise bestimmt werden. Durch mehrmaliges Wiederholen der gesamten Meßprozedur und statistische Auswertung kann die absolute Lokalisierung der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets, d.h. die Winkelmessung, verbessert werden.

Anstatt wie vorstehend beschrieben die Kalibrierung und die Distanzmessung zwischen den zu ortenden Strukturen, d.h. Meßstrukturen, in demselben biologischen Objekt durchzuführen, kann man auch die Kalibrierung unabhängig von den Meßstrukturen an gleichartigen biologischen Objekten durchführen. Bei dieser Verfahrensvariante ist die Unterscheidung zwischen den Fluoreszenzsignalen der Kalibriertargets und denjenigen der Meßstrukturen erleichtert. Anhand der mit den Kalibriertargets ermittelten Werte des optischen Versatzes kann man Eichkurven für die Distanzmessungen zwischen den Meßstrukturen erstellen. Derartige Eichkurven machen z.B. Angaben über den spektralen Versatz als Funktion von Brechungsindex und Absorption des verwendeten Immersionsmediums, der verwendeten Optik, Filter und Detektionseinheiten, der verwendeten Auswertalgorithmen, der verwendeten biologischen Objekte, der Lokalisation der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets in ihnen etc. Die Verwendung der Information aus diesen speziellen Eichkurven zur erfindungsgemäßen Distanzmessung bietet sich insbesondere in solchen Fällen an, bei denen einer größere Präzisionstoleranz verwendet erlaubt ist.

**BEISPIEL 3: Untersuchung und Darstellung von dreidimensional ausgedehnten Objekten mittels mehrdimensionaler Wellenfeldmikroskopie, erfindungsgemäßem Kalibrierverfahren und simultaner Bildaufnahme**

Üblicherweise wird von einem biologischen Mikroobjekt ein 3D-Datensatz durch sequentielle Registrierung gewonnen, z.B. in der konfokalen Laserscanningmikroskopie durch punktwises oder linienweises Abscannen des 3D-Objektvolumens; ein zweites Verfahren beruht auf der Registrierung der Fluoreszenzemission aus der Objektebene durch Positionierung eines Detektorarrays in der zu der Objektebene konjugierten Zwischenbildebene. üblicherweise ist die Position dieser Zwischenbildebene fixiert; um 3D-Informationen über das biologische Objekt zu erhalten, wird dieses sequentiell durch die zu der festen Zwischenbildebene konjugierte Objektebene hindurch bewegt; jedesmal wird ein 2D-Bilddatensatz der betreffenden Fluoreszenzemission registriert; und/oder das Objekt wird mit Hilfe axaltomographischer Verfahren um verschiedene Drehwinkel gedreht, wobei jedesmal 2D-Datensätze der zu der festen Zwischenbildebene konjugierten



Objektebene registriert werden.

Diese sequentielle Registrierung von Objektpunkten, Objektlinien oder Objektebenen hat verschiedene Nachteile: Z.B. kann ein Ausbleichen der Registrierung des 3D-Datensatzes zu einer Verschiebung der erfindungsgemäß bestimmten 3D-Schwerpunkte der Fluoreszenzverteilung von markierten Objektpunkten einer bestimmten spektralen Signatur führen. Ein anderer Nachteil besteht darin, daß die 3D-Datenaufnahme nicht schnell genug erfolgt, um auch bei nicht permanent stabil, d.h. sich bewegenden Objekten, insbesondere bei in vivo Markierungen wie z.B. bei fluoreszenzmarkierten Chromosomenregionen in Kernen lebender Zellen, die sich unter physiologischen Bedingungen mit Geschwindigkeiten bis zu einigen nm/sec (mittlere Verschiebung) bewegen können, eine befriedigende Bildqualität zu gewährleisten.

Um auch bei sich bewegenden Objekten eine befriedigende Abbildungsqualität zu erhalten, sieht die vorliegende Erfindung eine simultane Aufnahme des 3D-Datensatzes eines fluoreszenzmarkierten Objektes vor. Hierzu wird das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht einer gegebenen spektralen Signatur durch optische Elemente, z.B. Teilerspiegel, aufgespalten in N Teilstrahlen und auf N Detektorarrays abgebildet, die sich in N verschiedenen Zwischenbildebenen befinden, die zu N verschiedenen Objektebenen konjugiert sind. Eine einfache Abschätzung aufgrund der Abbildungsgleichung ergibt, daß die Abstände der Zwischenbildebenen (Detektorebenen) bei simultaner Registrierung eines Objektbereiches mit 10 µm axialer Ausdehnung und eines Objektivs von konventioneller Bildweite und hoher numerischer Apertur z.B. um einen Bereich in der Größenordnung  $\leq 20$  cm variiert werden müssen (abhängig vom verwendeten Objektiv). Durch weitere N Zwischenoptiken können die für Hochpräzisionsdistanzmessungen in relevanten Objektbereichen zu registrierenden N Objektebenen auch auf verschiedene Bereiche desselben, geeignet groß dimensionierten Detektorarrays (bzw. auf  $L < N$  Detektorarrays) abgebildet werden. In diesem Falle entspricht einem bestimmten Ausschnitt des/der L Detektorarrays eine der N konjugierten Objektebenen. Beispielsweise wird ein kleiner Objektbereich von wenigen µm Ausdehnung zur Vermessung in der Wellenfeldmikroskopie zunächst so grob positioniert, daß sein Schwerpunkt etwa im Zentrum des durch die Detektionspunktbildfunktion für eine bestimmte (Zwischen)Bildebene  $B_0$  gegebenen Beobachtungsvolumens des zur Registrierung verwendeten Mikroskopobjektivs liegt;

das vom 3D-Objekt ausgehende Fluoreszenzlicht wird nach seinen spektralen Signaturen getrennt und in  $N$  Teilstrahlen aufgespalten, die auf  $N$  Detektorarrays (von z.B. je  $8 \times 8$ ,  $16 \times 16$  oder  $64 \times 64$  Pixelgröße) abgebildet werden, deren Positionierung die Registrierung der Fluoreszenzemission aus  $N$  konjugierten Objektebenen um das Maximum der Detektionspunktbildfunktion (bezogen auf die Bildebene  $B_0$ ) gestattet.

Beispielsweise sind bei simultaner Aufnahme von Objekten mit einem Abstand von jeweils 20 nm nach einer einfachen Abschätzung unter obigen Annahmen Verschiebungen der konjugierten Zwischenbildebene um jeweils wenige 100  $\mu\text{m}$  (in der Nähe des Maximums der Punktbildfunktion) erforderlich, bzw. entsprechend kleine optische individuelle Korrekturen sind bei simultaner Detektion der relevanten Objektausschnitte auf einem einzigen (oder  $L < N$ ) Detektorarray(s) entsprechender Pixelzahlen auszuführen. Bei einer Teilung der Fluoreszenzemission z.B. in  $N=20$  Teilstrahlen gleicher Intensität vermindert sich die Anzahl der von jedem der  $N=20$  Detektorarray(s) (bzw. -

Ausschnitte) pro Zeiteinheit registrierten Photonenzahl um etwa den gleichen Faktor.

Die Lokalisationsgenauigkeit eines fluoreszenzmarkierten Objektes vermindert sich dann aufgrund der verschlechterten Photonenstatistik um schätzungsweise einen Faktor  $\sqrt{20}$

Dieser Nachteil kann durch eine Erhöhung der Registrierungszeit um den Faktor  $N$  (z.B.  $N=20$ ) beseitigt werden. In diesem Falle dauert die simultane Registrierung des Objektes etwa ebensolange wie bei sequentieller Registrierung. Bei Objekten mit Ausbleichverhalten besteht der Vorteil der simultanen dreidimensionalen Registrierung jedoch in einer für alle Targets (einer gegebenen spektralen Signatur) des Beobachtungsvolumens ähnlichen (bzw. ähnlicherem) Ausbleichverhalten; durch Ausbleichen verursachte Verschiebungen des Schwerpunktes des Fluoreszenzmissionsbildes werden hierdurch vermindert.

Bei Objekten mit zeitlich dynamischer Struktur (z.B. markierte Zellen in vivo) wird bei einer gegenüber der sequentiellen Registrierung um den Faktor  $N$  verkürzten Aufnahmezeit (z.B. 1 sec statt 20 sec) die Lokalisationsgenauigkeit der einzelnen Objektpunkte um schätzungsweise den Faktor  $\sqrt{N}$  (bei  $N=20$  z.B. 4.5) vermindert.

Beispielsweise ergibt sich bei einer 3D Lokalisationsgenauigkeit im Wellenfeldmikroskop von ca.  $\pm 3$  nm, erhalten mit sequentiellen Aufnahmezeiten von 1 sec pro Bildebene, unter den genannten Bedingungen bei simultaner Registrierung (1 sec) eine Verminderung auf eine Lokalisationsgenauigkeit auf schätzungsweise  $\pm 4.5 \cdot 3$  nm  $\approx 14$  nm bei simulta-

ner Aufnahme von 20 Objektebenen unter sonst gleichen Bedingungen. Bei einer (als Beispiel) angenommenen Objektbewegung (mittlere Verschiebung) von 5 nm/sec wäre die tatsächliche Lokalisationsungenauigkeit bei einer sequentiellen Aufnahme mit einer Gesamtregistrierungszeit von 20 sec bereits ohne Berücksichtigung von Ausbleicheffekten jedoch erheblich größer. Erfindungsgemäß ist hier die beschriebene simultane Registrierung von Objektebenen nicht nur hinsichtlich einer optischen Achse, sondern auch hinsichtlich zwei und drei orthogonalen optischen Achsen.

Bei Bedarf kann diese erfindungsgemäße simultane Bildaufnahme ohne weiteres mit einer herkömmlichen sequentiellen Bildaufnahme kombiniert werden.

#### **BEISPIEL 4 : DNA-Sequenzierung mittels mehrdimensionaler Wellenfeldmikroskopie**

Mittels bekannter Verfahren wie z.B. der Polymerase-Kettenreaktion werden alle komplementären Subsequenzen der zu analysierenden DNA-Sequenz hergestellt. Die Subsequenzen beginnen alle am selben Nukleotid der zu analysierenden Sequenz. Die zu analysierenden Bruchstücke werden alle am 3' Ende mit einem Bezugsfluorochrommarker  $\alpha$  markiert. Am anderen Ende, dem 5'-Ende, bzw. an definierten Zwischenstellen werden sie jeweils mit einem Fluorochrommarker a, g, c, t verschiedener spektraler Signatur markiert, je nachdem ob das Nukleotid die Base Adenin (Marker a), Guanin (Marker g), Cytosin (Marker c) oder Thymin (Marker t) trägt.

Alle Typen der verwendeten Fluorochrommarker unterscheiden sich in ihrer spektralen Signatur derart, daß die Fluorochrommarker  $\alpha$ , a, g, c, t (ggf. noch weitere) getrennt voneinander detektiert werden können; ein bestimmter Fluorochrommarker kann erfindungsgemäß von einem bis vielen Fluorochrommolekülen des gleichen oder verschiedenen Typs gebildet werden, wobei die Länge und Zusammensetzung der Fluorochrommarker erfindungsgemäß so gewählt wird, daß Distanzmessungen zwischen den Schwerpunkten der Intensitätsverteilungen von anfangsständigem Fluorochrommarker  $\alpha$  und endständigen Fluoreszenzmarkern (entweder a, oder g, oder c, oder t, oder ggf. weitere für weitere Basen) mit dem Verfahren der mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskopie möglich ist, d.h. Linkermoleküle für Fluoreszenzmarker müssen dabei beispielsweise

kürzer als  $1/2$  Nukleotiddurchmesser sein. Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung von längeren Linkermolekülen möglich, sofern diese eine Konfiguration von so hoher Steifigkeit besitzen, daß die durch sie verursachte Distanzvariation genügend klein ist, beispielsweise  $< 1/2$  Nukleotiddurchmesser beträgt.

Diese so markierten Subsequenzen repräsentieren die zu analysierende DNA-Sequenz vollständig. Die Fluoreszenzmarker a, g, c, t bzw. das Bezugsfluorochrom  $\alpha$  können jeweils ein oder mehrere Fluorochrommoleküle enthalten. Die DNA-Subsequenzen werden alle so auf geeignete Träger fixiert, daß sie als lineare Sequenz vorliegen.

Die fluorochrommarkierten DNA-Stücke werden mit Hilfe von DNA-Combing-Techniken linear ausgerichtet. Im Unterschied zum herkömmlichen "eindimensionalen" Wellenfeldmikroskop ist bei dem erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop eine zusätzliche präzise Ausrichtung der DNA-Stränge in Richtung der optischen Achse des Systems nicht mehr notwendig. Die DNA-Sequenzen werden vorzugsweise auf eine viereckige Glasfaser aufgebracht, deren Brechungsindex sich von demjenigen des umgebenden Mediums in minimaler Weise unterscheidet, wobei die Ausrichtung in einem bestimmten Winkel, insbesondere orthogonal zur Achse der Glasfaser erfolgt, und wobei der mittlere Abstand der Schwerpunkte der DNA-Sequenzen voneinander größer ist als die maximale Halbwertsbreite der zur Registrierung der Fluoreszenzsignale verwendeten Punktbildfunktionen. Ein weiteres Verfahren bindet das 3' Ende an ein Mikrokügelchen der spektralen Signatur  $\alpha$  und streckt anschließend den DNA-Faden mit dem Werkzeug der optischen Pinzette, wobei der "Pinzettenlaser" in seiner Wellenlänge geeignet gewählt werden muß.

Nach Linearisierung bzw. Orientierung der DNA-Sequenzen wird das so hergestellte Präparat fixiert und die molekulare Bewegung z.B. durch Temperaturniedrigung reduziert. Alternativ können die DNA-Enden auch in eine kristallin geordnete Festkörperstruktur eingebettet werden. Für die Messung wurden zu Zwecken der Kalibrierung weitere, insbesondere polychromatische Mikroobjekte auf die Glasfaser, den DNA-Objektträger oder in den Fixierungsfestkörper der DNA-Enden eingebracht. Die Kalibrierungsobjekte enthalten zusätzlich eine spektrale Signatur, die nicht a, t, c oder g ist. Die Linearisierung der DNA-Stränge kann entfallen, wenn alle Nukleotiden bei der Syn-

these des zu analysierenden DNA-Komplementärstranges geeignet fluoreszenzmarkiert werden.

Die fixierten DNA-Sequenzen werden in ein mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop eingebracht, wobei die linearen DNA-Subsequenzen so zu den stehenden Wellenfronten orientiert werden, daß eine exakte Abstandsmessung (Genauigkeit  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) zwischen  $\alpha$  und a bzw. g, c oder t — nach Bestimmung der Intensitätsbaryzentren und Kalibrierung der Abbildungseigenschaften — möglich ist.

Die Messung erfolgt bei in situ Kalibrierung unter Anwendung des erfindungsgemäßen Kalibrierverfahrens. Die Signale der Fluorochrommarker werden im Wellenfeldmikroskop mit geeignet angepaßten Schrittweiten spektral getrennt voneinander registriert (bevorzugt in digitaler Weise). Aus den Abständen der fluoreszenten Markern und ihrer spektralen Signatur läßt sich die DNA-Basensequenz des zu analysierenden DNA-Stückes bestimmen.

Statt einer spektralen Trennung oder zusätzlich zu ihr können auch Fluoreszenzlebensdauerparameter analysiert werden. In einer ersten Phase der Auswertung wird eine Grobbestimmung der Schwerpunkte der Fluorochrommarker-Signale vorgenommen und auf der Grundlage dieser Information die zu einer DNA-Sequenz gehörenden Signale nach den oben genannten Distanzkriterien von den zu einer anderen DNA-Sequenz gehörenden Signalen getrennt; in einer zweiten Phase der Auswertung werden die spektral getrennt registrierten, modulierten Signale der Fluorochrommarker mit Hilfe von geeignet angepaßten Funktionen analysiert; hieraus werden die Abstände z.B. der Schwerpunkte der anfangs- und endständigen Fluorochrommarker-Signale einer DNA-Sequenz voneinander mit molekularer Präzision bestimmt, wobei die an den Kalibrierungsobjekten vorgenommenen Messungen für eine Korrektur von Distanzaberrationen, z.B. chromatischer Verschiebungen, herangezogen werden; in einer dritten Phase der Auswertung werden die den Längen der DNA-Sequenzen entsprechenden Abstände der Fluorochrommarker-Signale nach zunehmender Länge getrennt nach Typus des endständigen Fluorochrommarkers (z.B. a, g, c, t) geordnet; die so erreichte Anordnung entspricht dem bei einem herkömmlichen Verfahren erzielten Muster, dem dann nach bekannten Methoden die gewünschte Sequenzinformation entnommen werden kann.

Bei Makromolekülen linearer Sequenz bzw. bekannter geordneter Struktur geht man

analog vor, wobei die Zahl und Art der Fluorochrommarker von Zahl und Art der Molekülbausteine abhängt.

Falls die Vermessung einzelner DNA-Stränge deren Ausrichtung in Richtung der optischen Achse erforderlich macht, kann erfindungsgemäß wie folgt verfahren werden: Das bekannte Ende der DNA-Kette wird zusätzlich zu einem Fluoreszenzmarker der spektralen Signatur  $\alpha$  mit einem chemischen "Marker" markiert. Der Rest der DNA-Kettenpräparation, insbesondere die Markierung der endständigen Fluoreszenzmarker a, c, g und t (Stopnukleotide) wird wie anfangs beschrieben durchgeführt. Die endständigen Basen und/oder die Marker der Stopnukleotide und ggf. weitere Basen der auszurichtenden DNA-Ketten tragen eine elektrische Ladung (z.B. negativ).

Die Ausrichtung der DNA-Ketten kann vor oder während der Mikroskopie erfolgen, zunächst wird das Verfahren der Ausrichtung vor der Mikroskopie beschrieben.

Die präparierten DNA-Ketten werden in Lösung in einem Puffer niedriger Ionenstärke auf einen speziell beschichteten Objektträger (oder Deckglas, was im folgenden auch als Objektträger bezeichnet werden soll) aufgebracht, der das chemisch markierte 3' Ende jeder DNA-Kette binden ("ankleben") kann. Der Lösung wird nun eine immobilisierende Komponente zugegeben, die nach einer bestimmten Zeit eine Aushärtung der DNA-Ketten in Lösung bewirkt. Der Objektträger wird mit einem (unbeschichteten) Deckglas abgedeckt und versiegelt, wobei der Abstand von Objektträger zum Deckglas mit einem geeigneten "Spacer" (z.B. einer dünnen Membran) auf einen wohldefinierten Wert eingestellt werden kann. Der so versiegelte Objektträger wird einem geeigneten homogenen, statischen elektrischen Feld ausgesetzt, welches die elektrisch geladenen Basen ausrichtet. Die Polung des elektrischen Feldes (beispielsweise des eines Kondensators) muß hierbei so angelegt sein, daß bei negativ (positiv) geladenen Basen die Kathode (Anode) bei dem beschichteten Objektträger (mit den "angeklebten" 3' Enden) und die Anode (Kathode) bei dem unbeschichteten Deckglas liegt. Die elektrischen Feldlinien verlaufen senkrecht zur Objektträgeroberfläche und die Stärke des elektrischen Feldes wird ausreichend hoch gewählt, um eine Ausrichtung der DNA-Ketten in der Lösung zu bewirken.

Nachdem die so ausgerichteten DNA-Ketten in dem Zwischenraum Objektträger – Deckglas immobilisiert sind, werden sie mit dem mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop wie vorstehend beschrieben aufgenommen bzw. vermessen.

Soll die Orientierung der DNA-Ketten während der mikroskopischen Aufnahme erfolgen, wird das oben beschriebene elektrische Feld erfindungsgemäß nach dem folgenden Verfahren aufgebaut:

Der beschichtete Objektträger ist ein elektrisch leitender Spiegel hinreichender Planität. Die Lösung der DNA-Ketten (niedrige Ionenstärke) ist geeignet viskos und es werden keine immobilisierenden Komponenten der Lösung zugegeben. Auch hier wird wieder (ggf. unter Verwendung eines geeigneten Spacers) ein Deckglas aufgebracht und versiegelt. Das Wellenfeld wird nun mit nur einem Objektiv in Verbindung mit dem Spiegel erzeugt, wobei das aus dem Objektiv austretende Anregungslicht vom Spiegel reflektiert wird und sich ein eindimensionales Wellenfeld (parallel zur Fokalebene oder zur Spiegeloberfläche) ausbildet. Das Anlegen einer positiven (negativen) Spannung bei der Verwendung von negativ (positiv) geladenen Basen bewirkt ebenfalls eine Ausrichtung der DNA-Ketten senkrecht zur Oberfläche des Spiegels, also entlang der optischen Achse des Mikroskops und die nun wie vorstehend beschrieben sequenziert werden können. Auch bei diesem Verfahren muß die Stärke des elektrischen Feldes groß genug sein, um die Ausrichtung der DNA-Ketten zu bewirken; thermische Bewegungen der Moleküle können z.B. durch Temperaturniedrigung reduziert werden.

Analog diesem Beispiel kann mit beliebigen anderen linearisierten Makromolekülen verfahren werden.

#### **BEISPIEL 5: Mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop Typ II mit lateraler räumlich modulierter Fluoreszenzanregung**

Das mehrdimensionale Wellenfeldmikroskop Typ II umfaßt in der Raumrichtungen  $x$  eine reelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen, einen Strahlteiler zur Auskopplung von Teilstrahlen als virtuelle Beleuchtungsquelle, und ein erstes Objektiv, das

diesen beiden Beleuchtungsquellen zugeordnet ist. In dieses erste Objektiv werden die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquellen derart eingekoppelt, daß sie auf der hinteren, dem Objektraum abgewandten Fokalebene (diese Ebene wird auch "back focal plane" genannt.) zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte erzeugen bzw. aufweisen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen in einem bestimmten Winkel aufeinander zu verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren:

Fokussiert man einen Lichtstrahl (Lichtwellenzug) mit einem geeigneten Abstand zur optischen Achse in diese Fokalebene, (die optische Achse steht senkrecht auf der Fokalebene und verläuft durch deren Mittelpunkt) so verläßt im Objektraum ein paralleles Lichtbündel mit ebenen Wellenfronten das Objektiv, und zwar unter einem bestimmten Winkel zur optischen Achse. Dieser Winkel ist variabel einstellbar, je nach dem, mit welchem Abstand zu optischer Achse die Lichtstrahlen in das Objektiv eingekoppelt werden und um welche Art von Objektiv es sich handelt.

Koppelt man den zweiten Lichtstrahlen (Lichtwellenzüge) unter einem solchen Winkel zu dem ersten und zur optischen Achse in dasselbe Objektiv ein, daß sein Fokuspunkt auf der hinteren Fokalebene diametral gegenüber dem Fokuspunkt des ersten Lichtstrahls liegt, daß also Fokuspunkt 1 — optische Achse — Fokuspunkt 2 eine Linie auf der hinteren Fokalebene bilden, entsteht in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen ein zweites paralleles Lichtbündel mit ebenen Wellenfronten, das in einem bestimmten Winkel zu dem ersten verläuft und mit diesem im Objektraum zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld mit Streifen maximaler Lichtintensität interferiert.

Dem ersten Objektiv ist ein zweites Objektiv mit Abstand spiegelbildlich gegenüber angeordnet, so daß diese beiden Objektive auf zwei gegenüber liegenden Seiten des dreidimensionalen Objektraums liegen. Diesem zweiten Objektiv ist eine dritte und eine vierte (reelle oder virtuelle) Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen so zugeordnet, daß man die Lichtstrahlen beider Beleuchtungsquellen — wie für das erste Objektiv beschrieben — auf die hintere, d.h. dem Objektraum abgewandte Fokalebene dieses zweiten Objektives fokussieren kann, in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen dieses zweiten Objektives zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld inter-



ferieren lassen kann, und im Objektraum mit dem eindimensionalen stehenden Wellenfeld des ersten Objektives so zur Interferenz bringen kann, so daß ein dreidimensionales Wellenfeld entsteht, mit Punkten maximaler Intensität, die sich im dreidimensionalen Raum fortsetzen.

Für die Erzeugung eines zweidimensionalen Wellenfeldes (d.h. Punkte maximaler Intensität in einer Ebene), wird der beschriebene Aufbau insoweit abgewandelt, daß man

entweder erstes und zweites Objektiv einsetzt, eines davon aber nur mit einer Beleuchtungsquelle kombiniert,

oder man setzt nur ein einziges Objektiv ein und kombiniert dieses mit einer dritten Beleuchtungsquelle, deren kohärenzfähige Lichtstrahlen man derart zu den Lichtstrahlen der beiden anderen Beleuchtungsquellen in dieses einzige Objektiv einkoppelt, daß die korrespondierenden drei Fokuspunkte auf der Fokalebene ein gleichschenkliges Dreieck bilden, durch dessen Mittelpunkt die optische Achse verläuft. Im Objektraum verlassen alle drei Lichtstrahlen das Mikroskopobjektiv mit dem gleichen Winkel zur optischen Achse aber jeder in eine andere Richtung.

Diese Variante des erfindungsgemäßen Wellenfeldmikroskops Typ II zur Erzeugung eines mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops unter Verwendung eines einzigen Objektivs kann auch zur Erzeugung eines dreidimensionalen Wellenfelds eingesetzt werden. Dazu lenkt man vier Lichtstrahlen in dasselbe Objektiv und zwar derart, daß die dazu korrespondierenden vier Fokuspunkte in der hinteren Fokalebene ein gleichseitiges Viereck bilden.

38  
A n s p r ü c h e

1. Wellenfeldmikroskop mit einem Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, das eine Beleuchtungsquelle, ein erstes Objektiv und ein zweites Objektiv oder einen Reflektor umfaßt, wobei erstes Objektiv und zweites Objektiv oder Reflektor derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines eindimensionalen stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum, der Halte und Manövriervorrichtung(en) für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv, ein Okular und einen Detektor umfaßt, dadurch gekennzeichnet,

daß das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in zwei oder allen drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Reflektor oder Strahlteiler zur Auskopplung von Teilstrahlen oder eine weitere Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen umfaßt, denen jeweils wenigstens ein Objektiv zugeordnet ist, und die jeweils zur Erzeugung von Lichtwellenzügen geeignet sind, wobei die Lichtwellenzüge der einen Beleuchtungsquelle antiparallel oder in variabel einstellbaren Winkeln zu den Lichtwellenzügen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle ausgerichtet sind, derart, daß die von der einen Beleuchtungsquelle ausgesendeten Lichtwellenzüge mit denen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle zu einem stehenden Wellenfeld mit ebenen Wellenfronten interferieren,

und daß das Detektionssystem wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur, welches mit seiner optischen Achse senkrecht zu den Wellenfronten eines der interferierenden Wellenfelder angeordnet ist, umfaßt, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann, wobei dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet ist, und dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

2. Wellenfeldmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in wenigstens einer Raumrichtung einem Objektiv hoher numerischer Apertur ein Objektiv niedriger numerischer Apertur oder ein Reflektor zugeordnet ist, und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) entweder zwei Objektive niedriger numerischer Apertur oder ein Objektiv niedriger numerischer Apertur und ein Reflektor einander zugeordnet sind.
3. Wellenfeldmikroskop mit einem Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, das eine Beleuchtungsquelle und ein Objektiv umfaßt, die derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum, der Halte- und Manöviervorrichtung(en) für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv, ein Okular und einen Detektor umfaßt, dadurch gekennzeichnet,

daß das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl aufweist, denen ein gemeinsames Objektiv zugeordnet ist, in das die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquelle(n) und des/der Strahlteiler(s) derart einkoppelbar sind, daß sie auf der hinteren (dem Objektraum abgewandten) Fokalebene zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte aufweisen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebene in variabel einstellbarem Winkel zueinander verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren,

und daß das Detektionssystem wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur umfaßt, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann, wobei dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet ist, und dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist

4. Wellenfeldmikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in derselben oder einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) jeweils wenigstens eine weitere reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und/oder wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl aufweist, dem/denen jeweils ein weiteres Objektiv zugeordnet ist, durch das der/die Lichtstrahlen (Lichtwellenzüge) in den Objektraum gelenkt und derart ausgerichtet sind, daß sie mit den Lichtstrahlen aus derselben oder aus der /den beiden anderen Raumrichtung(en) bzw. dem von diesen gebildeten ein- oder zweidimensionalen Wellenfeld zu einem zwei- bzw. dreidimensionalen Wellenfeld interferieren.
5. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Objektraum eine Objekthalterung umfaßt, in bzw. an der das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder gegebenenfalls Kalibriertarget(s) um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar in dem Wellenfeld gelagert ist, wobei für wenigstens eine Achse eine Drehbarkeit um 360-Grad ( $2\pi$ ) bevorzugt ist.
6. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die das mehrdimensionale Wellenfeld erzeugende(n) Beleuchtungsquellen und/oder der/die Reflektoren und/oder der/die Strahlteiler und/oder das/die Objektiv(e) und damit das mehrdimensionale Wellenfeld um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar ist/sind.
7. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Detektionssystem ein Scannerspiegel vorgesehen und derart angeordnet ist, daß er zur Abbildung der lateralen Objektbereiche mit der gewünschten, vorzugsweise maximalen Fluoreszenzintensität geeignet ist.

8. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen eine reelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) eine reelle und/oder virtuelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung umfaßt, und daß die damit erzeugten stehenden Wellenfelder ( $WF_1, WF_2, \dots, WF_i$ ) voneinander verschiedene Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$ ) und Distanzen ( $d_1, d_2, \dots, d_i$ ) zwischen den jeweiligen Wellenmaxima bzw. Wellenminima von  $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos\theta_1$  bzw.  $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos\theta_2$  bzw.  $d_i = \lambda_i / 2n \cos\theta_i$  aufweisen (mit:  $n$  = Brechungsindex im Objektraum,  $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_i$  = Kreuzungswinkel des Lichtwellenzugs der Wellenlänge  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$  mit der optischen Achse), und wobei die Wellenfelder  $WF_1, WF_2, \dots, W_i$  derart zueinander ausgerichtet sind, daß sich mindestens ein Maximum zweier oder aller stehenden Wellen an derselben Stelle (nämlich dem Ort einer Mehrphotonenanregung) befindet.
  
9. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine Anordnung aus Beleuchtungsquelle, Objektiv und einem elektrisch leitenden Spiegel, die zur Erzeugung eines eindimensionalen, elektrischen Wellenfeldes geeignet ist, relativ zur Objektträgerhalterung vorgesehen ist, und zwar derart, daß die in dem Objekt befindlichen Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets durch Anlegen des elektrischen Feldes — vor oder während des mikroskopischen Meßvorgangs — ausrichtbar sind.
  
10. Wellenfeldmikroskopieverfahren zur DNA-Sequenzierung unter Verwendung eines Wellenfeldmikroskops nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
  - es werden alle komplementären Subsequenzen der zu analysierenden DNA-Sequenz derart hergestellt, daß alle Subsequenzen am selben Nukleotid der zu analysierenden Sequenz beginnen,
  - die zu analysierenden Bruchstücke werden alle am 3'-Ende mit einem Bezugsfluorochrommarker  $\alpha$  und am 5'-Ende und/oder an definierten Zwischenstellen mit einem Fluorochrommarker a, g, c, oder t — je nachdem ob das Nukleotid die Base Adenin

(Marker a), Guanin (Marker g), Cytosin (Marker c) oder Thymin (Marker t) trägt — markiert, wobei die Fluorochrommarker a, g, c, t und  $\alpha$  verschiedene spektrale Signatur aufweisen, und jeweils ein oder mehrere Fluorochrommoleküle enthalten,

die markierten DNA-Subsequenzen werden derart auf Träger fixiert, daß sie als lineare Sequenz vorliegen, und in ein mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop eingebracht, wobei die linearen DNA-Subsequenzen so zu den stehenden Wellenfronten orientiert werden, daß eine exakte Abstandsmessung (Genauigkeit  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) zwischen  $\alpha$  und a bzw. g, c oder t nach Bestimmung der Intensitätsbaryzentren und Kalibrierung der Abbildungseigenschaften durchführbar ist,

indem die Signale der Fluorochrommarker schrittweise, spektral getrennt voneinander registriert werden,

und aus den Abständen der fluoreszenten Markern und ihrer spektralen Signatur die DNA-Basensequenz des zu analysierenden DNA-Stückes bestimmt wird.

11. Kalibrierverfahren für die mehrdimensionale Wellenfeldmikroskopie nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem

vor, während oder nach der Präparation des betreffenden Objekts auf einem bzw. in einem Objekthalter, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser, Objektträgerkapillare oder Objektträgerflüssigkeit, die zu untersuchenden bzw. zu ortenden Objektstrukturen — ist gleich Meßstrukturen — mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert werden, wobei zumindest solche zu ortenden Meßstrukturen, deren Abstand voneinander geringer ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener spektraler Signatur markiert werden,

mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert werden,

die fluoreszierenden Kalibriertargets entweder zusammen mit den Objekten bzw. Meßstrukturen oder separat auf bzw. in dem/ einem Objekthalter präpariert werden,

Meßstrukturen und Kalibriertargets unter übereinstimmenden Bedingungen, gleichzeitig oder nacheinander mikroskopisch untersucht werden,

und bei dem jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisa-

tionsverhaltens des jeweiligen optischen Systems vermessen werden, die dabei ermittelten Messwerte — gleich Ist-Werte — mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten — gleich Soll-Werten — verglichen werden, und aus der Differenz zwischen Ist-Werten und Soll-Werten ein Korrekturwert — ist gleich Kalibrierwert — bestimmt wird, mit dem der durch das optische System bedingte Versatz in der Detektion unterschiedlicher Emissionsloci, insbesondere der Meßstrukturen, korrigiert wird. dadurch gekennzeichnet,

daß das biologische Objekt mit den fluorochrommarkierten Meßstrukturen und/oder fluorochrommarkierten Kalibriertarget(s) sequentiell oder simultan mit einzelnen (separaten), in zwei oder drei Raumrichtungen orthogonal zueinander verlaufenden, stehenden und zu einem zwei- oder dreidimensionalen Wellenfeld miteinander interferierenden Wellenfeldern beleuchtet wird, wobei die Fluorochrome zur Fluoreszenzmission angeregt werden,

daß zur Detektion der Fluoreszenzintensität eine Kamera und/oder eine oder mehrere zweidimensionale Anordnung(en) aus Einzeldetektoren mit jeweils kreis-, ring- oder schlitzförmiger Blende oder eine Anordnung von mehreren kreis-, ring- oder schlitzförmigen Blenden verwendet wird/werden,

daß entweder das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder Kalibriertarget(s) oder das ein- bzw. zweidimensionale Wellenfeld oder beides während des Meßvorgangs schrittweise um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen gedreht wird, wobei die fluorochrommarkierten Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets sequentiell oder simultan mit einem oder zwei einzelnen, orthogonal zueinander stehenden Wellenfeldern beleuchtet werden.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/01908

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY) 18 August 1994	1
X	see page 3, line 12 - page 4, line 2 see page 13, last paragraph - page 16, line 17	3,7
Y	see page 18, line 11 - page 22, line 11 see page 23, line 1 - page 25, line 18; figures 1-8	10
Y	--- EP 0 732 584 A (IBM) 18 September 1996 see column 5, line 28 - line 42 see column 13, line 39 - line 45 see column 14, line 7 - line 28 see column 16, line 41 - column 17, line 7 see column 17, line 17 - line 22 see figure 8 --- -/--	10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1998

Date of mailing of the international search report

04/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 98/01908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY) 10 October 1996 see page 4, last paragraph see page 12, line 18 - line 20 see page 57, line 13 - line 15 see page 70, line 18 - line 26 see page 71, line 12 - page 72, line 33 see page 92, paragraph 1 see page 140, line 1 - line 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	10, 11
A	<p>B.BAILEY et al: "Optical subsectioning and multiple focal-plan imaging in the standing-wave fluorescence microscope" PROCEEDINGS 52nd ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159 XP002085004 see page 159, line 15 - line 17</p> <p style="text-align: center;">---</p>	11
A	<p>WO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 8 August 1996 see page 3, line 14 - page 4, line 11 see page 6, line 26 - page 7, line 6 see page 15, line 6 - page 17, line 27; figures 2-6</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>W. DENK ET AL: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" SCIENCE., vol. 248, no. 4951, 6 April 1990, pages 73-76, XP000381741 Washington DC cited in the application see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	8
A	<p>US 4 621 911 A (LANNI) 11 November 1986 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>V. KRISHNAMURTHI ET AL: "Image processing in 3-D standing-wave fluorescence microscopy" PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, vol. 2655, - 1996 pages 18-25, XP002085003</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01908

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9418594	A	18-08-1994	US 5394268 A	28-02-1995
			AU 691173 B	14-05-1998
			AU 6169994 A	29-08-1994
			CA 2155521 A	18-08-1994
			EP 0682780 A	22-11-1995
			JP 8509817 T	15-10-1996
			US 5801881 A	01-09-1998
EP 0732584	A	18-09-1996	US 5624845 A	29-04-1997
			US 5609744 A	11-03-1997
			US 5607568 A	04-03-1997
			US 5538898 A	23-07-1996
			JP 8256755 A	08-10-1996
WO 9631522	A	10-10-1996	US 5720928 A	24-02-1998
			AU 5532196 A	23-10-1996
			EP 0871640 A	21-10-1998
WO 9624082	A	08-08-1996	US 5671085 A	23-09-1997
			AU 4773896 A	21-08-1996
			CA 2210801 A	08-08-1996
			EP 0807273 A	19-11-1997
US 4621911	A	11-11-1986	NONE	

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01908

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N21/64 G02B21/06 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY) 18. August 1994 siehe Seite 3, Zeile 12 - Seite 4, Zeile 2	1
X	siehe Seite 13, letzter Absatz - Seite 16, Zeile 17 siehe Seite 18, Zeile 11 - Seite 22, Zeile 11	3,7
Y	siehe Seite 23, Zeile 1 - Seite 25, Zeile 18; Abbildungen 1-8	10
Y	EP 0 732 584 A (IBM) 18. September 1996 siehe Spalte 5, Zeile 28 - Zeile 42 siehe Spalte 13, Zeile 39 - Zeile 45 siehe Spalte 14, Zeile 7 - Zeile 28 siehe Spalte 16, Zeile 41 - Spalte 17, Zeile 7 siehe Spalte 17, Zeile 17 - Zeile 22 siehe Abbildung 8	10
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomas, R.M.

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 96 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY) 10. Oktober 1996 siehe Seite 4, letzter Absatz siehe Seite 12, Zeile 18 - Zeile 20 siehe Seite 57, Zeile 13 - Zeile 15 siehe Seite 70, Zeile 18 - Zeile 26 siehe Seite 71, Zeile 12 - Seite 72, Zeile 33 siehe Seite 92, Absatz 1 siehe Seite 140, Zeile 1 - Zeile 3 ---</p>	10,11
A	<p>B.BAILEY et al: "Optical subsectioning and multiple focal-plan imaging in the standing-wave fluorescence microscope" PROCEEDINGS 52nd ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159 XP002085004 siehe Seite 159, Zeile 15 - Zeile 17 ---</p>	11
A	<p>WO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 8. August 1996 siehe Seite 3, Zeile 14 - Seite 4, Zeile 11 siehe Seite 6, Zeile 26 - Seite 7, Zeile 6 siehe Seite 15, Zeile 6 - Seite 17, Zeile 27; Abbildungen 2-6 ---</p>	1
A	<p>W. DENK ET AL: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" SCIENCE, Bd. 248, Nr. 4951, 6. April 1990, Seiten 73-76, XP000381741 Washington DC in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---</p>	8
A	<p>US 4 621 911 A (LANNI) 11. November 1986 in der Anmeldung erwähnt ---</p>	
A	<p>V. KRISHNAMURTHI ET AL: "Image processing in 3-D standing-wave fluorescence microscopy" PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, Bd. 2655, - 1996 Seiten 18-25, XP002085003 -----</p>	

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Ir des Aktenzeichen

PCT/DE 98/01908

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9418594 A	18-08-1994	US 5394268 A	28-02-1995
		AU 691173 B	14-05-1998
		AU 6169994 A	29-08-1994
		CA 2155521 A	18-08-1994
		EP 0682780 A	22-11-1995
		JP 8509817 T	15-10-1996
		US 5801881 A	01-09-1998
EP 0732584 A	18-09-1996	US 5624845 A	29-04-1997
		US 5609744 A	11-03-1997
		US 5607568 A	04-03-1997
		US 5538898 A	23-07-1996
		JP 8256755 A	08-10-1996
WO 9631522 A	10-10-1996	US 5720928 A	24-02-1998
		AU 5532196 A	23-10-1996
		EP 0871640 A	21-10-1998
WO 9624082 A	08-08-1996	US 5671085 A	23-09-1997
		AU 4773896 A	21-08-1996
		CA 2210801 A	08-08-1996
		EP 0807273 A	19-11-1997
US 4621911 A	11-11-1986	KEINE	



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 21/64, G02B 21/06, C12Q 1/68</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/02974</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Januar 1999 (21.01.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01908</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Juli 1998 (09.07.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 29 512.6 10. Juli 1997 (10.07.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Seminarstrasse 2, D-69117 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUSMANN, Michael [DE/DE]; Paul-Löbe-Strasse 4, D-67071 Ludwigshafen (DE). CREMER, Christoph [DE/DE]; Mombertplatz 23, D-69126 Heidelberg (DE). BRADL, Joachim [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 33, D-69198 Schriesheim (DE). SCHNEIDER, Bernhard [DE/DE]; Finkenweg 14, D-67346 Speyer (DE).</p> <p>(74) Anwalt: RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. Gemäss Regel 91 Absatz 1(f), mit einem Berichtigungsantrag.</i></p>	
(54) Title: WAVE FIELD MICROSCOPE, METHOD FOR A WAVE FIELD MICROSCOPE, INCLUDING FOR DNA SEQUENCING, AND CALIBRATION METHOD FOR WAVE FIELD MICROSCOPY			
(54) Bezeichnung: WELLENFELDMIKROSKOP, WELLENFELDMIKROSKOPIEVERFAHREN, AUCH ZUR DNA-SEQUENZIERUNG, UND KALIBRIERVERFAHREN FÜR DIE WELLENFELDMIKROSKOPIE			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to two new wave field microscopes (type I and type II) characterized in that they each have a stimulation and illumination system comprising at least one real and one virtual light source and at least one lens (in the case of type II) or two lenses (in the case of type I). The light sources and lens(es) are positioned in relation to each other in such a way that they are suitable for generating one, two or three-dimensional wave fields in the object space. The calibration method provided for in the invention has been adapted to these wave field microscopes and allows for geometrical distance measurements between fluorochrome-marked object structures the distance of which can be less than the half-intensity width of the principal maximum of the effective point image function. The invention also relates to a method for DNA sequencing by wave field microscopy.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft zwei neue Wellenfeldmikroskope Typ I und Typ II, die sich dadurch auszeichnen, daß sie jeweils ein Anregungs- und Beleuchtungssystem umfassen, das wenigstens eine reelle und eine virtuelle Beleuchtungsquelle und wenigstens ein Objektiv (im Fall von Typ II) bzw. zwei Objektive (im Fall von Typ I) umfaßt, wobei Beleuchtungsquellen und Objektiv (e) derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung von ein-, zwei-, und dreidimensionalen stehenden Wellenfeldern im Objektraum geeignet sind. Das erfindungsgemäße Kalibrierverfahren ist an diese Wellenfeldmikroskope angepaßt und erlaubt geometrische Distanzmessungen zwischen fluorochrommarkierten Objektstrukturen, deren Distanz geringer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion sein kann. Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur wellenfeldmikroskopischen DNA-Sequenzierung.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Wellenfeldmikroskop,  
Wellenfeldmikroskopieverfahren, auch zur DNA-Sequenzierung,  
und Kalibrierverfahren für die Wellenfeldmikroskopie**

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Wellenfeldmikroskop mit einem Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, das wenigstens eine reelle und eine virtuelle Beleuchtungsquelle und wenigstens ein Objektiv umfaßt, wobei Beleuchtungsquellen und Objektiv (e) derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines eindimensionalen stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum, der Halte und Manövriervorrichtung(en) für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv, ein Okular und einen Detektor umfaßt, sie betrifft außerdem ein daran angepaßtes Kalibrierverfahren für geometrische Distanzmessungen zwischen fluorochrommarkierten Objektstrukturen, deren Distanz geringer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion sein kann, und sie betrifft ein darauf aufbauendes Verfahren zur wellenfeldmikroskopischen DNA-Sequenzierung.

**Stand der Technik**

Durch den Einsatz hochspezifischer Marker, wie z.B. DNA-Proben oder Protein-Sonden, ist es möglich, in biologischen (Mikro-)Objekten, insbesondere in Zellen, Zellkernen, Zellorganellen oder auf Chromosomen, – im folgenden vereinfacht Objekt genannt –, nahezu beliebig kleine (Sub-)Strukturen zu markieren. Es können Strukturen in Dimensionen von einigen  $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}$  m) bis zu wenigen zehn nm ( $10^{-9}$  m) spezifisch dargestellt werden. Die Marker sind üblicherweise mit Fluorochromen oder auch kolloidalen Mikro(gold-)partikel gekoppelt, um ihre optische Detektion und Abbildung zu erleichtern bzw. überhaupt erst zu ermöglichen.

Um zwei Marker innerhalb desselben Objekts separat voreinander detektieren zu können, sind die betreffenden Marker häufig mit verschiedenfarbigen Fluorochromen gekoppelt. Das zur Verfügung stehende Farbemissionsspektrum der üblicherweise verwendeten



Fluorochrome reicht von tiefblau über grün, rot bis in den infraroten Spektralbereich. Es können aber auch Fluorochrome verwendet werden, die sich weder in ihrem Anregungsspektrum noch in ihrem Fluoreszenzspektrum unterscheiden, sondern bei denen die Lebensdauer ihrer Fluoreszenzemission als Parameter zur Unterscheidung genutzt wird. Letztere haben den Vorteil, daß wellenlängenabhängige fokale Shifts nicht auftreten. Fluorochrome können auch ein unterschiedliches Emissionsspektrum haben und damit verschiedene spektrale Signatur besitzen, aber mit derselben Photonenenergie anregbar sein, z.B. durch Mehrphotonenprozesse. Auch in diesem Fall können wellenlängenabhängige fokale Shifts in der Anregung zwischen Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur vermieden werden.

Die vorstehend genannten, an spezifische (Sub-)Strukturen in biologischen Mikroobjekten bindbaren bzw. gebundenen Fluorochrome werden im folgenden als Fluoreszenzmarker bezeichnet.

Stimmen Anregungsspektrum und/oder Emissionsspektrum und/oder die Fluoreszenzlebensdauern zweier Fluoreszenzmarker überein, so haben diese Fluoreszenzmarker hinsichtlich des betreffenden Parameters die gleiche spektrale Signatur. Unterscheiden sich die Fluoreszenzmarker in einem oder mehreren für die Messung relevanten Parametern, so haben sie unterschiedliche spektrale Signatur.

Unter Fluoreszenz wird im folgenden jede Photonenwechselwirkung verstanden, bei der zwischen dem Anregungsspektrum und dem Emissionsspektrum desselben Stoffes Unterschiede auftreten, die nicht auf monochromatische Absorption oder Streuung zurückgeführt werden können. Dies schließt insbesondere auch Mehrphotonenwechselwirkungen ein, bei denen die Anregungswellenlängen größer sein können als die Emissionswellenlängen.

Ferner wird hier der Begriff Fluoreszenz auch für die eng damit verwandten Phänomene der Lumineszenz, insbesondere die Phosphoreszenz verwendet. Dies schließt insbesondere längere mittlere Fluoreszenzlebensdauern ein, z.B. Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von bis zu mehreren oder vielen msec (Millisekunden). Im folgenden werden die

eng verwandten Vorgänge der Lumineszenz, Phosphoreszenz und Fluoreszenz als gleichermaßen erfindungsrelevant angesehen.

Die Detektion und Abbildung von Fluoreszenzmarker in ausgedehnten biologischen Objekten und die quantitative Lokalisation bezüglich definierter Objektpunkte /Objektstrukturen (Distanz- und Winkelmessungen) wird mit lichtmikroskopischen Meßverfahren durchgeführt. Hierbei spielt die sog. "Punktbildfunktion" (point spread function =PSF) oder "Punktantwort" des verwendeten Mikroskops oder allgemein des optischen Systems, d.h. dessen Fähigkeit, von einem "ideal punktförmigen" Objekt ein ebenso ideal punktförmiges Abbild zu erzeugen, eine entscheidende Rolle. Die Punktbildfunktion ist ein charakteristisches Merkmal einer jeden abbildenden Optik und ein Maß für deren Qualität.

Distanzmessungen zwischen Objektstrukturen hängen wesentlich von der effektiven — d.h. der lokal im markierten Objektpunkt gegebenen — Punktbildfunktion ab. Diese effektive Punktbildfunktion wiederum hängt stark von der jeweiligen lokalen Brechzahl und der Absorption im Objekt, im Einbettungsmedium des Objektes, in der Immersionsflüssigkeit und gegebenenfalls in den Deckgläsern ab.

Die effektive Punktbildfunktion unterscheidet sich im allgemeinen deutlich von der für das verwendete Mikroskop berechneten Punktbildfunktion. Auch die unter technisch optimierten Randbedingungen gemessenen Punktbildfunktionen unterscheiden sich in der Regel von den unter praktischen Routinelaborbedingungen in biologischen Objekten erzielbaren effektiven Punktbildfunktionen.

Da diese effektiven Punktbildfunktionen meist nicht zur Verfügung stehen, greift man zur Kalibrierung der Distanzmessungen auf ideale, berechnete Ergebnisse zurück bzw. auf Kalibrierungsmessungen, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurden, wie z.B. Reflexionsverfahren. Beide Verfahren gehen jedoch zu Lasten der Präzision bei der dreidimensionalen Distanzmessung in biologischen Mikroobjekten, und die Folge ist eine erhebliche Unsicherheit in der Bestimmung der tatsächlichen räumlichen Distanz zwischen den Objektstrukturen; bei biologischen Objekten beinhalten solche quantitativen Größenabschätzungen Unsicherheiten von bis zu mehreren Mikrometern.

Bis in die jüngste Zeit herrschte in der Fachwelt die praktisch einhellige Überzeugung, daß zwei Objektstrukturen nur dann separiert werden können, wenn sie mindestens eine Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion von einander entfernt sind.

Erst 1996 gelang es den Urhebern der vorliegenden Erfindung, ein Kalibrierverfahren für die Fernfeldmikroskopie (und auch die Flußfluorometrie) bereitzustellen, mit dem es möglich ist, Distanzmessungen zwischen Objektstrukturen, deren Abstand voneinander geringer ist als das Auflösungsvermögen des betreffenden Fernfeldmikroskops, d.h. die weniger als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion voneinander entfernt liegen, unabhängig von der Lage der betreffenden Objektstrukturen im dreidimensionalen Raum, mit hoher Genauigkeit durchzuführen.

Dieses Verfahren umfaßt die folgenden Schritte :

- Vor, während oder nach der Präparation des betreffenden Objekts auf bzw. in einem Objekthalter, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser/-kapillare oder Objektträgerflüssigkeit, werden die zu untersuchenden bzw. zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener und/oder gleicher spektraler Signatur markiert, d.h. solche zu ortende Strukturen (Meßstrukturen), die sich in unmittelbarer Nähe zueinander, nämlich innerhalb der Halbwertsbreite des Hauptmaximums ihrer effektiven Punktbildfunktion, befinden, werden mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener spektraler Signatur markiert, während solche Meßstrukturen, deren Abstand voneinander größer ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert werden. Zwei zu ortende Meßstrukturen dürfen immer dann mit der gleichen spektralen Signatur markiert sein, wenn sie z.B. durch ihre relative Lage oder durch andere Kriterien eindeutig identifiziert werden können.
- Mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen werden Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert,
- die fluoreszierenden Kalibriertargets werden entweder zusammen mit den Objekten oder separat auf bzw. in dem bzw. einem Objekthalter (Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser/-kapillare, Objektträgerflüssigkeit o.a.) präpariert.

- (Untersuchungs-)Objekt und Kalibriertargets werden unter übereinstimmenden Bedingungen, gleichzeitig oder nacheinander mikroskopisch oder fluoßfluorometrisch untersucht.
- Jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur werden unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems (Mikroskop oder Flußfluorometer) vermessen, die dabei ermittelten Meßwerte gleich Ist-Werte werden mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten gleich Soll-Werten (d.h. den aufgrund der Geometrie berechneten Soll-Lokalisationen) verglichen, und die Differenz zwischen Ist-Werten und Soll-Werten, nämlich der Kalibrierwert, wird zur Korrektur des durch das optische System bedingten Versatzes in der Detektion unterschiedlicher Emissionsloci insbesondere der Meßstrukturen verwendet.

Mit anderen Worten: Die Distanzmessung zwischen den (je nach Abstand voneinander) mit verschiedenen oder gleichen spektralen Signaturen markierten Objekt-(Sub-) Strukturen - im folgenden auch Meßstrukturen genannt - wird anhand der hochpräzisen Lokalisation unabhängiger (Kalibrier-)Targets mit entsprechend spektraler Signatur und mit bekannter Größe und räumlicher Anordnung, unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems durchgeführt, wobei die Kalibriermessung zwischen den (Kalibrier-) Targets und die Messung im biologischen Objekten unter gleichen System- und Randbedingungen stattfindet. Diese Kalibriertargets haben dieselbe oder eine höhere Multispektralität wie die zu messenden (Objekt-)Strukturen. Sie können direkt in den biologischen Objekten angeordnet sein, oder als separate Präparate auf einem Objekthalter (Objektträgerplättchen oder Objektträgerfaser/-kapillare oder Objektträgerflüssigkeit o.ä.) vorliegen oder Teil eines Objekthalters sein.

Zwei oder mehrere fluoreszierende Meßstrukturen in intakten, dreidimensionalen biologischen Objekten, deren Abstand und Ausdehnung kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion ist, können aufgrund ihrer unterschiedlichen spektralen Signatur (Fluoreszenzabsorptionswellenlängen und/oder Fluoreszenzemissionswellenlängen und/oder Fluoreszenzemissionslebensdauern) diskriminiert werden, d.h. ihr Abstand untereinander kann bestimmt werden.

Die Abstandsmessung wird auf die Lokalisation der einzelnen Meßstrukturen reduziert und kann — nun auch in der optischen Fernfeldmikroskopie oder Flußfluorometrie — mit einer wesentlich höheren Genauigkeit als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion durchgeführt werden. Die Lokalisation des Schwerpunkts der betreffenden Meßstrukturen wird auf die Maximalintensität ihres Fluoreszenzsignals angepaßt. D. h. aus dem gemessenen (beugungsbegrenzten) Signals (=Intensitätskurve) eines Fluoreszenzpunktes (=fluoreszierende Meßstruktur) wird — unter Berücksichtigung der Gesamtinformation aus Haupt- und Nebenmaxima — der Schwerpunkt (das Baryzentrum) des Signals bestimmt und damit der Ort der Meßstruktur. Bei fehlerfreiem optischen System und infolgedessen idealer Symmetrie der gemessenen Intensitätsverteilung (=Verlauf der Intensitätskurve) kolokalisiert der Schwerpunkt (das Baryzentrum) der Intensitätskurve innerhalb der Lokalisationsgenauigkeit mit dem Hauptmaximum (=Maximum 0. Ordnung des Beugungsbildes) der gemessenen Intensitätsverteilung. Dieses neue Kalibrierverfahren erlaubt es mittels optischer Fernfeld-Mikroskopie wie z.B. der Wellenfeldmikroskopie (oder auch mittels Scanning-Flußfluorometrie,) geometrische Distanzen in biologischen Mikro-Objekten zu messen, wobei die zu bestimmenden Distanzen geringer sein können als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion im Objekt. Da der Informationsgehalt der damit durchgeführten Distanzbestimmungen einer bei erhöhter Auflösung gewonnenen Distanzmessung entspricht, kann (und wird im folgenden) auch abkürzend von "Auflösungsäquivalent" gesprochen werden.

Die multispektrale Kalibrierung erlaubt es, in situ Messungen über das Abbildungsverhalten des Systems am konkreten biologischen Objekt durchzuführen. Bei Verwendung der Fluoreszenzlebensdauer als alleinigem Parametertyp und/oder bei Anregung der Fluorochrome mit derselben bzw. denselben Photonenenergie(n) entfällt aufgrund der Kalibrierung die in situ Korrektur des chromatischen Versatzes in der Objektebene. Für höchstauflösende Fernfeld-Mikroskoptypen wie z.B. das Wellenfeldmikroskop und bei Verwendung geeigneter Fluoreszenzmarker ermöglicht dieses Kalibrierverfahren dreidimensionale geometrische Distanzmessungen in biologischen Objekten bis hinunter zu molekularer Präzision (d.h. Auflösungsäquivalent besser 10 nm).

Zur Ermittlung von Ist- und Sollwerten, zu deren Vergleich und zur Bestimmung des Korrekturwerts/Kalibrierwerts werden vorzugsweise die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt:

- ein oder mehrere Kalibriertargets B mit einem Abstand größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion vom Schwerpunkt der N Meßstrukturen wird/werden mit einer beliebigen spektralen Signatur markiert,
- die Abstände  $d_{ik}$  ( $i, k = 1 \dots N, i \neq k$ ) der Schwerpunkte der spektral getrennten Beugungsfiguren der N Meßstrukturen und die Abstände  $d_{iB}$  der N Meßstrukturen zum Kalibriertarget B werden gemessen, wobei automatisierte Verfahren der Bildanalyse angewendet werden,
- für eine Meßstruktur werden die Strecken  $d_{ik}$  und  $d_{iB}$  jeweils in der Ebene der schmalsten Punktbildfunktion sowie alle übrigen Distanzen gemessen werden, wozu das Objekt axialtomographisch jeweils um einen definierten Winkel  $\phi_m$  gedreht wird,
- optische Aberrationen aus den Kalibrierungsmessungen werden korrigiert, und an die korrigierten gemessenen Abstände  $d_{ik}(\phi_m)$  und  $d_{iB}(\phi_m)$  wird jeweils eine Cosinusfunktion  $A_{ik} \cos(\phi_m + \theta_{ik})$  bzw.  $A_{iB} \cos(\phi_m + \theta_{iB})$  mit geeigneter Phasenverschiebung angepaßt,
- die Maxima  $A_{ik}$  und  $A_{iB}$  der Anpassungsfunktion von  $d_{ik}$  bzw.  $d_{iB}$  werden durch den Vergrößerungsfaktor dividiert und als euklidischer Abstand  $D_{ik}$  bzw.  $D_{iB}$  der N Meßstrukturen untereinander bzw. der Abstände der Meßstrukturen zum Bezugspunkt B bestimmt.

Für die Bestimmung der Maxima werden vorzugsweise zusätzlich die diesen entsprechenden Minima des Abstandes  $z_{ik}, z_{iB}$  in der zu der Ebene der  $d_{ik}, d_{iB}$  orthogonalen Ebene herangezogen und analog ausgewertet.

Die Ermittlung aller Koordinaten der N Meßstrukturen und ihrer Relativkoordinaten zum Bezugspunkt B, d.h. die Ermittlung der Positionen  $x_i, y_i, z_i$  und  $x_k, y_k, z_k$  bzw. der Abstände  $x_k - x_i, y_k - y_i, z_k - z_i$  und  $x_B - x_i, y_B - y_i, z_B - z_i$ , erfolgt erfindungsgemäß auf der Grundlage der mikroskopisch gemessenen 3D-Abstände  $D_{ik}$  bzw.  $D_{iB}$ , vorzugsweise unter Verwednung des folgenden Gleichungssystems

$$D_{ik}^2 = (x_k - x_i)^2 + (y_k - y_i)^2 + (z_k - z_i)^2$$

$$D_{iB}^2 = (x_B - x_i)^2 + (y_B - y_i)^2 + (z_B - z_i)^2$$

$$D_{kB}^2 = (x_B - x_k)^2 + (y_B - y_k)^2 + (z_B - z_k)^2$$

Zur Absicherung der ermittelten Meßergebnisse sollte die vorstehend beschriebene Vorgehensweise für mehrere Kalibriertargets B und die gleichen N Meßstrukturen durchgeführt werden.

Die Koordinaten und Abstände der N Meßstrukturen können anhand der Schwerpunkte ermittelt werden, die sich aus Schwerpunktmittelungen der Messungen zu allen Bezugspunkten ergeben.

Insbesondere für graphische Darstellungen werden die ermittelten Positionen  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$  und  $x_B$ ,  $y_B$ ,  $z_B$  vorzugsweise mit einer Punktbildfunktion gefaltet, die eine Halbwertsbreite mit dem jeweils erreichten Auflösungsäquivalent besitzt.

Zur Fluorochrommarkierung von Meßstrukturen und Kalibriertargets werden vorzugsweise solche Fluorochrome verwendet, die im ultravioletten, sichtbaren und/oder infraroten Lichtwellenlängenbereich angeregt werden können und die im ultravioletten, sichtbaren und/oder infraroten Lichtwellenlängenbereich emittieren.

Als Kalibriertargets können entweder biologische Kalibriertargets oder nicht-biologische bzw. synthetische Kalibriertargets eingesetzt werden.

Bei den biologischen Kalibriertargets handelt es sich um markierte Regionen des biologischen Objekts mit bekannter Distanz voneinander. Die Markierung(en) der betreffenden Region(en) kann(können) beispielsweise mit geeigneten biochemischen Sonden durchgeführt werden. Die Verwendung solcher biologischer Kalibriertargets hat gegenüber der Verwendung synthetischer Kalibriertargets, beispielsweise Kalibrierkugeln, den praktischen Vorteil, daß bei der Kalibrierung neben den optischen Randbedingungen des Objektes zusätzlich präparativ bedingte Randeffekte in die Kalibrierung einfließen, wie z.B. das Verhältnis aus tatsächlichem Fluoreszenzsignal zu unspezifischem Hintergrund (das durch automatische Bildanalysealgorithmen bestimmt wird).

Als nicht-biologische bzw. synthetische Kalibriertargets eignen sich ganz besonders Mikrokugeln, die die gleiche oder eine höhere multispektrale Signatur als die zu ortenden Meßstrukturen aufweisen. Sie werden wie die biologischen Objekte behandelt. Solche Kalibriertargets sind vorzugsweise auf Objekthaltern in definierter Raumanordnung fixiert. Die Fixierung kann bereits bei der Fabrikation der betreffenden Objektträger geschehen, was insbesondere für die Routinebenutzung von Vorteil ist.

Zur Behebung des bei allen bekannten Fernfeldmikroskopieverfahren bestehenden Problems, daß die Breite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion und damit die Auflösungsgrenze von der relativen Lage im Raum abhängt, d.h. z.B. senkrecht zur optischen Achse (= lateral) schmaler ist als in Richtung der optischen Achse (= axial), kann das genannte Kalibrierverfahren sehr gut mit den im Stand der Technik bekannten sog. Mikroaxialtomographieverfahren kombiniert werden. Bei diesen Mikroaxialtomographieverfahren werden die (biologischen) Objekte in Kapillaren oder auf Glasfasern angeordnet und im bzw. unter dem Mikroskop definiert um eine Achse, die normalerweise senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops steht, gedreht werden, wobei Abstandsmessungen in derjenigen Richtung durchgeführt werden, die die schmalste Halbwertsbreite der effektiven Punktbildfunktion besitzt.

Ein Fernfeld-Lichtmikroskopieverfahren, das sich für die Detektion und Abbildung von insbesondere sehr kleinen, durch Fluoreszenzmarker kenntlich gemachte Substrukturen in biologischen Objekten besonders eignet, weil es gegenüber den bekannten Epifluoreszenzmikroskopieverfahren oder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie den Vorteil aufweist, daß es auch in axialer Richtung - senkrecht zu den Wellenfronten - eine Tiefendiskriminierung und damit wesentlich verbesserte Auflösung ermöglicht (ihre Dimension kann bei hoher Numerischer Apertur wesentlich geringer als die Wellenlänge des zur Anregung verwendeten Lichtes sein), ist das Wellenfeldmikroskopieverfahren.

Bei der Wellenfeldmikroskopie, wie sie z.B. in der US-Patentschrift 4,621,911 beschrieben ist, werden fluoreszierende bzw. lumineszierende Präparate im optischen Mikroskop mit einem stehenden Wellenfeld beleuchtet (Standing Wave Field Fluorescence Microscopy, SWFM). Ein stehendes Wellenfeld entsteht (nur) dort, wo Licht kohärenzfähig überlagert wird. Die Präparate werden in einer Zone äquidistanter ebener Wellenfronten angeordnet und zur Fluoreszenz oder Phosphoreszenz angeregt. Der Abstand der Wellenfronten und ihre Phase können (insbesondere zur Bilderzeugung) variiert werden. Aus einzelnen optischen Schnitten kann durch Computer-Bildverarbeitung die dreidimensionale Verteilung der fluoreszenten bzw. lumineszenten Objektpunkte rekonstruiert werden.



Die ebenen Wellenfronten sind senkrecht zur optischen Achse des detektierenden Objektives angeordnet und werden durch kohärente Überlagerung zweier Laserstrahlen unter einem definierten Winkel  $\theta$  zur optischen Achse des Mikroskopsystems erzeugt, wobei der Winkel  $\theta$  den Abstand der Wellenfronten untereinander bestimmt — bei gegebener Wellenlänge und Brechungsindex. An Stelle von zwei sich kreuzenden Laserstrahlen kann das Wellenfeld auch dadurch erzeugt werden, daß ein Laserstrahl nach geeigneter Reflexion unter einem bestimmten Winkel (z.B. mit einem Spiegel) mit sich selbst zur Interferenz gebracht wird. Die ebenen Wellenfronten zeichnen sich dadurch aus, daß der Intensitätsverlauf in Richtung senkrecht zu den Wellenfronten (co)sinusförmig ist.

Die Fluoreszenz bzw. Lumineszenz wird entweder durch entsprechende optische Filter spektral diskriminiert und in verschiedenen Strahlengängen geführt oder konfokal detektiert. Die erzielbare Auflösung, d.h. die kleinste noch meßbare Distanz zwischen zwei punktförmigen Objektstrukturen, die mit Fluorochromen gleicher spektraler Signatur markiert sind, ist entweder durch das Abbe-Kriterium (= das Maximum 0. Ordnung des Beugungsbildes eines Punktojektes ist im 1. Minimum des Beugungsbildes eines zweiten Punktojektes lokalisiert) oder durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion gegeben. Sie hängt von der jeweiligen Wellenlänge, der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, sowie von den lokalen Brechzahlen der Objekte, des Einbettungsmediums, der eventuell verwendeten Deckgläser und der eventuell eingesetzter Immersionsflüssigkeiten ab.

Die bekannten Wellenfeldmikroskope sind im Prinzip wie folgt aufgebaut: Sie umfassen

- (I) ein Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, bestehend aus wenigstens einer reellen und einer virtuellen Beleuchtungsquelle und wenigstens einem Objektiv, die derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines eindimensionalen, sinusförmigen, stehenden Wellenfeldes geeignet sind,
- (II) einen Objektraum, mit Halte und Manövrier Vorrichtungen für das Objekt, und
- (III) ein Detektionssystem, bestehend aus wenigstens einem Objektiv, wenigstens einem Okular

und wenigstens einem Detektor, wobei es sich häufig um eine Kamera, insbesondere eine CCD-Kamera handelt, die so positioniert ist, daß der CCD-Chip in der Zwischenbildebene liegt.

Ein Nachteil dieses Wellenfeldmikroskops nach dem Stand der Technik, im folgenden "eindimensionales Wellenfeldmikroskop" ("SWFM") genannt, bzw. der damit durchführbaren Wellenfeldmikroskopieverfahren besteht darin, daß das periodisch erzeugte Wellenfeld (bei epifluoreszenter Detektion in Verbindung mit Verfahren des Optical Sectioning) zu einer Mehrdeutigkeit in der Aufnahme bzw. Abbildung einer Objektstruktur führt, deren Ausdehnung in Richtung senkrecht zu den Wellenfronten wesentlich größer als  $\lambda/2n$  ist ( $\lambda$ =Wellenlänge der Anregung,  $n$ = effektiver Brechungsindex). Diese Mehrdeutigkeit erschwert zunächst eine effektive Nutzung der durch das Interferenzmuster erzielten Auflösungsverbesserung.

Zur Durchführung von Distanzmessungen und anderen Untersuchungen der räumlichen Verhältnisse von dreidimensionalen Objekten können die bekannten Fernfeldmikroskopieverfahren einschließlich der eindimensionalen Wellenfeldmikroskopie mit Axialtomographie kombiniert werden. Hierzu werden die zu untersuchenden biologischen Objekte, ggf. nach Ausrüstung mit Kalibriertargets, in oder auf einer Mikrokapillare oder Glasfaser als Objekthalter bzw. Objektträger präpariert. Die Kapillare/Faser hat einen exakt definierten Durchmesser, wobei verschiedene Durchmesser möglich sind. Zur Festlegung dieser Kapillare/Faser auf dem Mikroskoptisch dient eine spezielle Halterung vorgeschlagen, die aus einem starren, vorzugsweise dorsiventral abgeplatteten Rahmen besteht, an bzw. auf dem wenigstens eine Lagerbuchse montiert ist, in der eine Mikrokapillare oder Glasfaser um ihre Längsachse rotierfähig (vorzugsweise mit der Rotationsachse senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops) gelagert werden kann. (Die Lagerbuchse(n) sollten so angeordnet sein, daß die Rotationsachse der Kapillare/Faser senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops verläuft.) Die Drehung der Untersuchungsobjekte in oder an der Kapillare/Faser erfolgt durch Drehung der Kapillare/Faser direkt, vorzugsweise mittels eines Drehmotors.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Wellenfeldmikroskop der bekannten Art derart weiter zu bilden, daß es zur Erzeugung von ebenen Wellenfeldern in mehr als einer Dimension bei hoher Variabilität der Abstände der Interferenzmaxima geeignet ist, und das vorgenannte Kalibrierverfahren derart weiter zu entwickeln, daß es in Kombination mit einem solchen Wellenfeldmikroskop einsetzbar ist. Darüber hinaus soll ein Verfahren zur wellenfeldmikroskopischen DNA-Sequenzierung geschaffen werden.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht einerseits in der Bereitstellung der nachstehend beschriebenen sog. "mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskope", andererseits in der Bereitstellung des ebenfalls nachstehend beschriebenen, an die Anwendung eines mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops angepaßten Kalibrierverfahrens. Darüber hinaus wird ein Verfahren zur "Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung" bereit gestellt.

Bei dem einen erfindungsgemäßen "mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop" (Typ I) handelt es sich um ein Wellenfeldmikroskop der eingangs genannten Art, das durch die nachfolgend aufgelisteten Merkmale gekennzeichnet ist:

- (1) Das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem umfaßt in zwei oder allen drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Reflektor oder Strahlteiler zur Auskopplung von Teilstrahlen oder eine weitere Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen, denen jeweils wenigstens ein Objektiv zugeordnet ist, und die jeweils zur Erzeugung von Lichtwellenzügen geeignet sind, wobei die Lichtwellenzüge der einen Beleuchtungsquelle antiparallel oder in variabel einstellbaren Winkeln zu den Lichtwellenzügen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle ausgerichtet sind, und zwar derart, daß die von der einen Beleuchtungsquelle ausgesendeten Lichtwellenzüge mit denen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle zu einem stehenden Wellenfeld mit ebenen Wellenfronten interferieren.
- (2) Das Detektionssystem umfaßt wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur, welches mit seiner optischen

Achse senkrecht zu den Wellenfronten eines der interferierenden Wellenfelder angeordnet ist und welches mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann. Dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ist ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet, während dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

Unter "hoher" numerischer Apertur ist hier eine numerische Apertur  $\geq 1$  und unter "niedriger" numerischer Apertur eine numerische Apertur  $< 1$  zu verstehen.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Wellenfeldmikroskops (Typ I) ist in wenigstens einer Raumrichtung einem Objektiv hoher numerischer Apertur ein Objektiv niedriger numerischer Apertur oder ein Reflektor zugeordnet, und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) sind entweder zwei Objektive niedriger numerischer Apertur oder ein Objektiv niedriger numerischer Apertur und ein Reflektor einander zugeordnet.

Bei dem anderen erfindungsgemäßen "mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop" (Typ II) handelt es sich um ein Wellenfeldmikroskop der eingangs genannten Art, das durch die folgenden Merkmale charakterisiert ist:

- (1) Das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem umfaßt in wenigstens einer der drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl, denen ein gemeinsames Objektiv zugeordnet ist, in das die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquelle(n) und des/der Strahlteiler(s) derart eingekoppelt werden können, daß sie auf der hinteren (dem Objektraum abgewandten) Fokalebene zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte erzeugen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen in variabel einstellbarem Winkel zueinander verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren.

- (2) Das Detektionssystem umfaßt wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann. Dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ist ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet, während dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform dieses Wellenfeldmikroskops (Typ II) weist das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in derselben oder einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) jeweils wenigstens eine weitere reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und/oder wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl auf, dem/denen jeweils ein weiteres Objektiv zugeordnet ist, durch das der/die Lichtstrahlen (Lichtwellenzüge) in den Objektraum gelenkt und derart ausgerichtet sind, daß sie mit den Lichtstrahlen aus derselben oder aus der /den beiden anderen Raumrichtung(en) bzw. dem von diesen gebildeten ein- oder zweidimensionalen Wellenfeld zu einem zwei- bzw. dreidimensionalen Wellenfeld interferieren.

Eine weitere, sehr vorteilhafte Weiterbildung sämtlicher vorstehend genannten erfindungsgemäßen Wellenfeldmikroskope (Typ I und Typ II) zeichnet sich dadurch aus, daß der Objektraum eine Objekthalterung umfaßt, in bzw. an der das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder gegebenenfalls den/die Kalibriertarget(s) um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar in dem Wellenfeld gelagert ist, wobei für wenigstens eine Achse eine Drehbarkeit um 360-Grad ( $2\pi$ ) bevorzugt ist.

Mit diesen erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskopen Typ I und Typ II ist es möglich, eine zeitlich sequentielle und/oder simultane Detektion mehrerer Objektebenen durch eine, zwei und/oder drei Objektive (bzw. zu deren orthogonalen Achsen) durchzuführen. Präzisionsdistanzmessungen von Punktobjekten gleicher oder verschiedener spektraler Signatur, deren Abstände kleiner als die Halbwertsbreiten der Hauptmaxima der effektiven Punktbildfunktionen sind, können in (allen) Raumrichtungen vorgenommen werden.

Die feststehende(n) konfokale(n) Detektionsringblende(n), -lochblende und/oder der/die feststehende(n) Detektionsschlitz(e) in Kombination mit wenigstens einem geeigneten Lichtintensitätsdetektor bietet/bieten die vorteilhafte Möglichkeit, daß das Objekt in x-, y- und z-Richtung durch das Wellenfeld gerastert werden kann (Objekt- oder Stage-scanning).

Das erfindungsgemäße Wellenfeldmikroskop Typ II und die damit durchführbaren Wellenfeldmikroskopie hat — insbesondere gegenüber der bekannten eindimensionalen Wellenfeldmikroskopie — überdies den Vorteil, daß sowohl die laterale Auflösung (d.h. senkrecht zur optischen Achse) als auch die axiale Auflösung wesentlich verbessert ist.

Es ist erstmals eine Diskriminierung von flächenhaften Objekten in axialer Richtung ohne den Einsatz von konfokalen Systemen möglich. Außerdem besteht die vorteilhafte Möglichkeit, daß man das Objekt während der Untersuchung bzw. zur Aufnahme / Datenregistrierung in lateraler Richtung verschieben kann. Mit Hilfe von Bildverarbeitungs- und Rekonstruktionsverfahren läßt sich dann aus den somit erhaltenen Mehrfachaufnahmen eine höhere laterale Auflösung gewinnen. Der erfindungsgemäße Aufbau Typ II mit einem Objektiv eignet sich außerdem auch zur Erzeugung eines eindimensionalen Wellenfeldes senkrecht zur optischen Achse eines Epifluoreszenzmikroskops und damit zur lateralen Auflösungsverbesserung desselben.

Bei einer weiteren Ausführungsvariante dieser "Mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskope" (Typ I und/oder Typ II) sind die das mehrdimensionale Wellenfeld erzeugende(n) Beleuchtungsquelle(n) und/oder der/die Reflektor(en) und/oder der/die Strahlteiler und/oder das/die Objektiv(e) und damit das mehrdimensionale Wellenfeld um

eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar angeordnet bzw. montiert.

Zur Abbildung der lateralen Objektbereiche eines im zwei- oder dreidimensionalen Wellenfeld feststehenden Objekts auf die Detektorringblende, -lochblende bzw. den Detektorschlitze kann jedes erfindungsgemäße Wellenfeldmikroskop (Typ I und/oder Typ II) mit einem Scannerspiegel ausgerüstet sein, der derart angeordnet ist, daß er die betreffenden lateralen Objektbereiche mit der gewünschten, meist maximalen, Fluoreszenzintensität abbildet.

Bei einer besonders vorteilhaften Weiterbildung der erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskope (Typ I und/oder Typ II), die für Zwei- oder Mehr-Photonen-Fluoreszenzanregungen geeignet ist, den sog. "Wellenfeldmikroskopen mit kombinierter Mehr-Photonen-Fluoreszenzanregung", umfaßt das jeweilige Beleuchtungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen eine reelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) eine reelle und/oder virtuelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung. Die damit erzeugten stehenden Wellenfelder ( $WF_1, WF_2, \dots, WF_i$ ) weisen voneinander verschiedene Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$ ) auf, und die Distanzen ( $d_1, d_2, \dots, d_i$ ) zwischen ihren jeweiligen Wellenmaxima bzw. Wellenminima betragen  $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos \theta_1$  bzw.  $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos \theta_2$  bzw.  $d_i = \lambda_i / 2n \cos \theta_i$  (mit:  $n$  = Brechungsindex im Objektraum,  $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_i$  = Kreuzungswinkel des Lichtwellenzugs der Wellenlänge  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$  mit der optischen Achse). Diese Wellenfelder  $WF_1, WF_2, \dots, W_i$  sind erfindungsgemäß derart zueinander ausgerichtet, daß sich mindestens ein Maximum zweier oder aller stehenden Wellen an derselben Stelle, nämlich dem Ort einer Mehrphotonenanregung, befindet.

Geeignete Beleuchtungsquellen für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung sind im Stand der Technik bekannt und z.B. in der Druckschrift von W.Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", Science, Vol. 248, pp.73-76 (6. April 1990) beschrieben, auf deren Inhalt hier ausdrücklich Bezug genom-

men wird. Diese Beleuchtungsquellen produzieren entweder Photonen unterschiedlicher Wellenlängen oder kohärente Photonen gleicher Wellenlänge.

Ein besonderer Vorteil der Kombination aus Ein- und Zwei- oder Mehrphotonenanregung besteht in der gleichzeitigen Anregung von Fluoreszenzmarkern verschiedener spektraler Signatur. Hierdurch können Fehler der Distanzmessung aufgrund der chromatischen Aberration im Objekt eliminiert werden. Bei der Zwei-Photonen-Anregung wird ein Fluorochrommolekül dann angeregt, wenn zwei Photonen simultan die Energie für die Anregung eines Moleküls liefern. Dabei können die zwei an der Anregung des Moleküls beteiligten Photonen dieselbe oder unterschiedliche Wellenlängen bzw. Energieen besitzen. Für eine koinzidente Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2$ ) müssen bei der sog. "Zwei-Photonen-Wellenfeldmikroskopie" in jeder jeweiligen Raumrichtung jeweils zwei Wellenfelder mit den Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  installiert sein. Die Wellenmaxima bzw. Wellenminima der beiden stehenden Wellenfelder (WF1, WF2) haben dabei die Distanzen  $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos\theta_1$  bzw.  $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos\theta_2$  (wobei gilt:  $n$  = Brechungsindex im Objektraum,  $\theta_1, \theta_2$  = Kreuzungswinkel des Laserstrahls der Wellenlänge  $\lambda_1, \lambda_2$  mit der optischen Achse). Da im allgemeinen die Distanzen  $d_1$  und  $d_2$  verschieden sind, werden die beiden Wellenfelder pro Raumrichtung so ausgerichtet, daß ein Hauptmaximum beider stehender Wellen sich an derselben Stelle befindet. Mehrphotonen-Effekte können dann nur dort auftreten, wo beide Wellenfelder sich überlagern. Damit werden nur noch einzelne "Streifen" des Wellenfeldes einer Raumrichtung zur Mehrphotonenanregung genutzt. Vieldeutigkeiten bei Objekten der Dimension größer  $d$  treten erst bei Dimensionen mit der Bedingung  $k_1 d_1 = k_2 d_2$  ( $k_1, k_2$  sind ganze Zahlen) auf. Durch eine Mehrphotonenanregung der fluoreszenzmarkierten Meßstrukturen und Kalibriertargets wird somit eine Eindeutigkeit der dreidimensionalen Abbildung erreicht. Die Verwendung von Zwei- oder Mehrphotonenfluoreszenzanregungsverfahren ermöglicht ein schnelleres Abscannen bzw. Abrastern des Objekts, d.h. der Objektpunkte, -linien und -ebenen und damit eine bessere Abbildungsqualität insbesondere auch bei sich bewegenden Objekten.



Eine ebenfalls sehr vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops zeichnet sich dadurch aus, daß eine Anordnung aus Lichtquelle, Objektiv und einem elektrisch leitenden Spiegel, die zur Erzeugung eines eindimensionalen, elektrischen Wellenfeldes geeignet ist, relativ zur Objektträgerhalterung vorgesehen ist, und zwar derart, daß die in dem Objekt befindlichen Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets im Bedarfsfall (z.B. wenn sich diese an bzw. in Molekülketten befinden) durch Anlegen des elektrischen Feldes — vor oder während des mikroskopischen Meßvorgangs — ausgerichtet werden können. (Die auf diese Weise räumlich ausgerichteten Molekülketten können dann anschließend noch mit immobilisierenden Substanzen fixiert werden.) Diese Variante des erfindungsgemäßen Wellenfeldmikroskops ist vor allem für die wellenmikroskopische DNA-Sequenzierung geeignet, wobei das eindimensionale elektrische Wellenfeld zur Kalibrierung bei der DNA-Sequenzierung dient.

Zur Detektion des Lumineszenzlichtes wird vorzugsweise eine CCD-Kamera(s) in bekannter Weise eingesetzt. Diese kann hinter der Detektorringblende oder -lochblende oder dem Detektorschlitze sitzen. Anstelle der CCD-Kamera bzw. des CCD-Chips kann das erfindungsgemäße mehrdimensionale Wellenfeldmikroskop aber auch mit einer elektronischen Bildaufnahmeverrichtung ausgerüstet sein, wie sie beispielsweise von Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopen (CLSM) im Stand der Technik bekannt ist. Erfindungsgemäß kann prinzipiell jedes lichtempfindliche Detektionsgerät, insbesondere Photodiode(n), Photomultiplier, CCD-Kameras/-Chips, CCD-Arrays, Avalanche Dioden, (Avalanche) Dioden Arrays, zweidimensionale (Avalanche) Dioden Matrizen hinter der Detektorringblende oder -lochblende oder dem Detektorschlitze angeordnet sein, um die Fluoreszenz zu detektieren und zu dokumentieren, wobei auch Fluoreszenzlebensdauermessungen vorgenommen werden können.

Bei dem erfindungsgemäßen Kalibrierverfahren handelt es sich um ein Kalibrierverfahren der vorstehend genannten Art, das durch die folgenden Maßnahmen gekennzeichnet ist:

- (1) Das biologische Objekt mit den fluorochrommarkierten Meßstrukturen und/oder den/die fluorochrommarkierten Kalibriertargets wird sequentiell oder simultan mit

einzelnen (separaten), in zwei oder drei Raumrichtungen orthogonal zueinander verlaufenden, stehenden und zu einem zwei- oder dreidimensionalen Wellenfeld miteinander interferierenden Wellenfeldern beleuchtet, wobei die Fluorochrome zur Fluoreszenzemission angeregt werden.

- (2) Zur Detektion der Fluoreszenzintensität wird/werden eine Kamera und/oder eine oder mehrere zweidimensionale Anordnung(en) aus Einzeldetektoren mit jeweils kreis-, ring- oder schlitzförmiger Blende oder eine Anordnung von mehreren kreis-, ring- oder schlitzförmigen Blenden verwendet
- (3) Entweder das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder die/den Kalibriertargets oder das ein- bzw. zweidimensionale Wellenfeld oder beides wird während des Meßvorgangs schrittweise um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen gedreht, wobei die fluorchrommarkierten Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets sequentiell oder simultan mit einem oder zwei einzelnen, orthogonal zueinander stehenden Wellenfeldern beleuchtet werden.

Bei der simultanen Beleuchtung wird das Mikroobjekt mit den Meßstrukturen und den bzw. die Kalibriertargets starr oder um eine Achse drehbar gelagert. Zwei oder drei orthogonal zueinander verlaufende, stehende, ebene Wellenfelder werden zur Interferenz gebracht und beleuchten das Mikroobjekt simultan. Bei zwei Wellenfeldern entstehen Ebenen mit einem zweidimensionalen symmetrischen Gitter aus Punkten maximaler und minimaler Intensität. Bei der Verwendung von drei Wellenfeldern entsteht ein dreidimensionales Raumgitter aus symmetrisch regelmäßig angeordneten Punkten maximaler und minimaler Intensität. Zwischen den Intensitätsmaxima und -minima liegt ein kontinuierlicher Intensitätsverlauf vor.

Bei der sequentiellen Beleuchtung wird das Mikroobjekt im Wellenfeld um zwei Achsen gedreht. Während oder nach der Detektion kann die Lage des Wellenfeldes relativ zum Objekt verändert werden.

Bei Verwendung geeigneter Fluoreszenzmarker erlaubt die Erfindung somit, dreidimensionale (3D), geometrische Distanzmessungen zwischen Fluoreszenztargets gleicher bzw. verschiedener spektraler Signatur mit molekularer Präzision, d.h. mit einem 3D Auflösungsäquivalent bis zu besser als 10 nm und mit einer 3D Lokalisationsgenauigkeit bis zu besser als 1 nm. Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie bzw. zur optischen und nicht-

optischen Nahfeldmikroskopie bleibt die dreidimensionale Struktur des zu untersuchenden Objektes intakt, da auf mechanische Schnitte verzichtet wird. Damit können in dreidimensional konservierten Mikroobjekten 3D-Distanzmessungen in einem Bereich kleiner als die Halbwertsbreite der Hauptmaxima der effektiven Punktbildfunktionen vorgenommen werden. Insbesondere eröffnet das Verfahren die Möglichkeit, dreidimensionale Distanzmessungen auch unter vitalen Bedingungen des biologischen Objektes durchzuführen. Bei der DNA-Sequenzierung kann die Herstellung von Gelen und die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Stücke entfallen. Ebenso kann auf eine Autoradiographie verzichtet werden, da keine radioaktive Markierung durchgeführt wird. Und auch lange DNA-Sequenzen (z.B. > 1 kbp) können ohne weiteres analysiert werden.

Diese erfindungsgemäße Verfahrensvariante erlaubt außerdem eine wesentlich verbesserte Bestimmung auch morphologischer Größen (z.B. Volumen, Oberflächen), sofern die multispektralen Fluoreszenzmarker in geeigneter Weise z.B. auf der Oberfläche des Objektes, verteilt werden. Beispielsweise kann auf diese Weise das Volumen eines sphärischen Mikroobjektes mit einem Radius von einigen 100 nm erheblich besser bestimmt werden als das mit herkömmlichen mit morphologischen Segmentierungstechniken, wie z.B. Cavalieri- und Voronoi Verfahren, oder auch Methoden des Volumenkonservierenden Gradual Thresholding möglich ist.

Mit dem bzw. den erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskopen (Typ I und/oder Typ II) und dem erfindungsgemäßen Kalibrierverfahren ist es möglich eine mikroskopische DNA-Sequenzierung durchzuführen. Hierfür wird erfindungsgemäß das nachfolgen beschriebene "Wellenfeldmikroskopieverfahren zur DNA-Sequenzierung" vorgeschlagen:

- (1) Es werden alle komplementären Subsequenzen der zu analysierenden DNA-Sequenz derart hergestellt, daß alle Subsequenzen am selben Nukleotid der zu analysierenden Sequenz beginnen.
- (2) Die zu analysierenden Bruchstücke werden alle am 3'-Ende mit einem Bezugsfluorochrommarker  $\alpha$  und am 5'-Ende und/oder an definierten Zwischenstellen mit einem Fluorochrommarker a, g, c, oder t — je nachdem ob das Nukleotid die Base Adenin

- (Marker a), Guanin (Marker g), Cytosin (Marker c) oder Thymin (Marker t) trägt — markiert, wobei die Fluorochrommarker a, g, c, t und  $\alpha$  verschiedene spektrale Signatur aufweisen, und jeweils ein oder mehrere Fluorochrommoleküle enthalten.
- (3) Die markierten DNA-Subsequenzen werden derart auf Träger fixiert, daß sie als lineare Sequenz vorliegen, und in ein ein- oder mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop eingebracht.
  - (4) Die linearen DNA-Subsequenzen werden so zu den stehenden Wellenfronten orientiert, daß eine exakte Abstandsmessung (Genauigkeit  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) zwischen  $\alpha$  und a bzw. g, c oder t — nach Bestimmung der Intensitätsbaryzentren und Kalibrierung der Abbildungseigenschaften — durchgeführt werden kann, indem
  - (5) die Signale der Fluorochrommarker schrittweise, spektral getrennt voneinander registriert werden, und
  - (6) aus den Abständen der fluoreszenten Markern und ihrer spektralen Signatur die DNA-Basensequenz des zu analysierenden DNA-Stückes bestimmt wird.

Mit diesem im Stand der Technik völlig neuartigen Verfahren können DNA-Fragmente in ihrer Länge nukleotidgenau vermessen werden, und auch ihre Basensequenz kann exakt bestimmt werden. Gelelektrophorese und nachfolgende Bandenauswertung kann entfallen.

#### **Ausführungs- und Vergleichsbeispiele zur näheren Erläuterung der Erfindung :**

##### **BEISPIEL 1: Aufbau eines mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops Typ I mit drehbar gelagertem Objekt**

Die Basis stellt ein herkömmliches "eindimensionales" Wellenfeldmikroskop dar, das z.B. mit zwei sich gegenüber liegenden Objektiven hoher Numerischer Apertur oder mit einem Objektiv hoher gegenüber einem Objektiv niedriger numerischer Apertur oder mit einem Objektiv für zwei interferierende Laserstrahlen aufgebaut wird. Durch die Objektive werden zwei Teilstrahlen eines Lasers so zur Interferenz gebracht, daß ein eindimen-

sionales stehendes Wellenfeld entsteht. Über ein oder zwei Objektiv(e) hoher Numerischer Apertur wird die Fluoreszenz detektiert. Jeweils in einer oder in beiden orthogonalen Richtungen zur optischen Achse des Detektionsobjektivs werden jeweils zwei weitere Teilstrahlen des Lasers über Objektive niedrigerer Numerischer Apertur und/oder Fokussierlinsensysteme in geeignetem Abstand eingekoppelt und so miteinander und mit dem eindimensionalen stehenden Wellenfeld zur Interferenz gebracht, daß ein zwei- oder dreidimensionales symmetrisches Intensitätsmuster aus Intensitätsmaxima und -minima entsteht.

In dieses "mehrdimensionale" Wellenfeldmikroskop wird zur Objektlagerung ein Mikroaxialtomograph eingebaut.

Bei der Axialtomographie wird anstelle des Glas-Objektträgers eine Mikrokapillare oder eine Glasfaser eingesetzt, die drehbar gelagert ist und das (biologische) Objekt in sich aufnimmt (Kapillare) oder an dem das (biologische) Objekt geeignet aufgebracht ist (Kapillare/Faser). Manuell oder mit einem computergesteuerten Schrittmotor kann die Kapillare/Faser, die üblicherweise senkrecht zur optischen Achse des Detektionsobjektivs angeordnet wird, um die Faserachse um einen definierten Winkel gedreht werden. Eine Drehung um einen Winkel von 360 Grad ( $2\pi$ ) ist möglich. Der Trägerhalter für die Kapillare/Faser ist auf einem Halbkreis drehbar gelagert. Die Drehachse verläuft dabei senkrecht zur optischen Achse des Detektionsobjektivs.

Die Detektion der räumlichen Anordnung der Mikrotargets und ihrer Distanz erfolgt mittels des erfindungsgemäßen Kalibrierverfahrens und digitaler Bildanalyse. Mehrdeutigkeiten von Intensitätsverläufen, d.h. z.B. Intensitätshaupt- und -nebenmaxima von fluoreszenten "Punkt"-targets, können mit Hilfe geeigneter Computeralgorithmen statistisch ausgewertet werden und damit zu einer Erhöhung der Lokalisationspräzision beitragen. Bei ausgedehnten Objekten können Mehrdeutigkeiten durch Zwei- oder Mehr-Photonen Anregung mit Photonen verschiedener Wellenlänge reduziert werden.

**BEISPIEL 2: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Chromosomen in einem Zellkern mittels mehrdimensionaler Wellenfeldmikroskopie, erfindungsgemäßem Kalibrierverfahren und ggf. Axialtomographie**

(I) In einem Zellkern nimmt das Chromatin der einzelnen Chromosomen definierte Teilregionen ein. Innerhalb einer oder mehrerer solcher chromosomalen Teilregionen werden die zu ortenden Strukturen, d.h. die Meßstrukturen, z.B. kleine Chromosomenabschnitte wie Gene oder Teilstücke von Genen, mit einer im Stand der Technik bekannten Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung spezifisch markiert, und zwar mit Fluorochromen verschiedener bestimmter spektraler Signaturen  $M_1, M_2, M_3, \dots$ . Die Abstände zwischen den Markierungsorten (den markierten Meßstrukturen) liegen unter der klassischen Auflösung, d.h. sie sind kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion. Die Markierung der (Objekt-) Strukturen (Meßstrukturen) erfolgt derart, daß die spektralen Signaturen an den zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) mit nahezu der gleichen Dynamik vertreten sind.

Das biologische Objekt wird auf einer Glasfaser exakt definierten Durchmessers oder in einer runden oder rechteckigen Kapillare definierter Dimensionen präpariert.

(II) Um die Distanzen zu bestimmen, werden mikroskopierbare Präparate mit Kalibriertargets hergestellt, und zwar unter den gleichen physikalischen und chemischen Versuchsbedingungen wie das Objekt bzw. die zu ortenden Objektstrukturen (= Meßstrukturen).

Als Kalibriertargets bzw. als Präparate mit Kalibriertargets dienen beispielsweise:

a) mikroinjizierbare Kügelchen einer spektralen Signatur (monochromatisch):

Die Kügelchen sind nach bekannten Verfahren mit jeweils einem Fluorochrom, d.h. monochromatisch markiert und aufgrund ihrer Größe von den auszumessenden (zu ortenden) Strukturen im Objekt (den Meßstrukturen) unterscheidbar. Man injiziert solche Kalibrierkügelchen, die die im Objekt vorhandenen spektralen Signaturen der Meßstrukturen repräsentieren, ansonsten aber vorzugsweise identisch sind (hinsichtlich Größe, Geometrie, Materialbeschaffenheit etc.). Mit anderen Worten: Die spektralen Signaturen

der Meßstrukturen sowie der Kalibriertargets werden so gewählt, daß unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen die von ihnen emittierten Fluoreszenzemissionen getrennt voneinander analysiert werden können. Die Injizierung und Fixierung der monochromatischen Kalibrierkügelchen erfolgt derart, daß sich die einzelnen Kügelchen verschiedener spektraler Signatur in Clustern direkt an der Glasfaser-Oberfläche oder Kapillarwand anordnen, vorzugsweise in einer Querschnittsebene der Faser bzw. Kapillare. Bei Verwendung von Präzisionsfasern und/oder -kapillaren liegen die Kügelchen folglich in definierten Abstände voneinander bzw. von einer Bezugsebene, Bezugsachse oder Bezugslinie.

b) mikroinjizierbare Testkügelchen multispektraler Signatur (polychromatisch) und gleicher spektraler Dynamik:

Die Kügelchen sind nach bekannten Verfahren mit jeweils allen bei den markierten (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) vorkommenden spektralen Signaturen markiert. Infolgedessen können sie an beliebige Stellen im zu vermessenden biologischen Objekt (hier Kern) injiziert werden. Eine Sollgeometrie wie bei a) ist nicht erforderlich, da für jede Signatur die chromatischen Schwerpunkte an derselben Stelle lokalisiert sein sollen. Zur Unterscheidung von den markierten (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) können die Kügelchen entweder einer anderen Größenklasse angehören oder aber eine zusätzliche spektrale Signatur tragen, die bei den zu messenden Strukturen d.h. den Meßstrukturen (gemäß Präparationsprotokoll) nicht vorkommt.

c) simultan markierte Chromosomenregionen bekannter Distanz an einem anderen Chromosom als demjenigen, das die zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) trägt:

Die Kalibriertargets, d.h. hier die Chromosomenregionen mit bekanntem Abstand voneinander, sind mit Hilfe einer Probenkombination von DNA-Sequenzen, die die verschiedenen spektralen Signaturen trägt, unterschiedlich markiert. Eine Unterscheidung der chromosomalen Kalibriertargets von den zu ortenden (Chromosomen-) Strukturen (Meßstrukturen) kann beispielsweise durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität erfolgen oder durch ein unterschiedliches Intensitätsverhältnis zwischen Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur oder durch Verwendung eines zusätzlichen Fluorochroms

mit abweichender spektraler Signatur, das bei der Fluoreszenzmarkierung der Meßtargets nicht verwendet wurde.

Es ist auch möglich, daß die Kalibriertargets einer anderen Größenklasse angehören als die zur ortenden Meßstrukturen.

(III) Die Distanzmessungen werden mit einem erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop, kombiniert mit Photomultiplier und/oder Kamera und Datenverarbeitungsanlage, durchgeführt. Von dem biologische Mikroobjekt, hier im Beispiel einem Zellkern, wird eine Serie optischer Schnitte aufgenommen. Die Meßstrukturen  $M_1, M_2, M_3, \dots, M_L$  besitzen  $l = 1, 2, \dots, L$  spektrale Signaturen. Die spektrale Signatur der Kalibriertargets  $U_1, U_2, U_3, \dots, U_L$  unterscheiden sich von derjenigen der Meßstrukturen z.B. in Volumen, Durchmesser, Intensität oder in der Zahl der spektralen Signaturen ( $l = 1, 2, \dots, L + 1$ ). Die Bilder der optischen Schnitte werden für jede spektrale Signatur getrennt aufgenommen und gegebenenfalls noch der Untergrund korrigiert. Zur Auswertung werden zum einen die Kalibriertargets identifiziert und der chromatische Versatz bestimmt. Dazu werden die Kalibriertargets unter jeder spektralen Signatur lokalisiert und die Abstände zwischen den Kalibriertargets mit Fluorochrommarkierungen verschiedener spektraler Signatur gemessen. Die gemessenen Lokalisationen (d.h. die gemessenen Targetabstände) werden mit den aufgrund der Geometrie berechneten Soll-Lokalisationen (d.h. den tatsächlichen Targetabständen) verglichen und daraus der spektral bedingte Versatz (Shift) bestimmt.

Dieser Versatz (Shift) ist der Kalibrierwert für die gemessenen Distanzwerte zwischen den zu ortenden (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen).

Da dieser Versatz von den optischen Eigenschaften des Präparates abhängt (z.B. Brechzahlen in den Kernen und dem Präparationsmedium), sollte die Kalibrierung in situ erfolgen. Das heißt im vorliegenden Beispiel, daß sich die Kalibriertargets neben den zu untersuchenden und markierten (chromosomalen) Strukturen (Meßstrukturen) im Kern befinden sollten.

Zum anderen werden die Abstände zwischen den zu ortenden (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) lokalisiert. Man bestimmt dabei in jeder spektralen Signatur zunächst unabhängig voneinander die Position der Schwerpunkte der gemessenen Intensitätssigna-



le, d.h. es werden die Abstände zwischen den verschiedenen Farbsignalen bzw. Farbpunkten der betreffenden Meßstrukturen, z.B. zwischen dem rotfluoreszierenden und dem grünfluoreszierenden Farbpunkt (von Intensitätsmaximum zu Intensitätsmaximum oder von Schwerpunkt/Baryzentrum zu Schwerpunkt/Baryzentrum) gemessen, und dieser Meßwert wird um den mit den Kalibriertargets ermittelten (durch die verschiedene spektrale Signatur bedingten) Versatz in hochpräziser Weise korrigiert.

Die korrigierten Positionen der Meßstrukturen werden in Bezug auf einen Vergleichspunkt angegeben. Dieser Vergleichspunkt kann z.B. ein beliebig ausgezeichnete fester Punkt im Objekt oder der Schwerpunkt eines Kalibriertargets (z.B. eine markierte Chromosomenregionen) oder eines sonstwie ausgezeichneten Chromosomenterritoriums sein. Es kann aber auch die Schwerpunktskoordinate aller Meßstrukturen innerhalb eines Chromosomenterritoriums sein.

Bei Kalibriertargets in Gestalt von mikroinjizierbaren Testkügelchen mit multispektraler Signatur (polychromatisch) wird der chromatische Versatz aus dem Lokalisationsunterschied der Schwerpunkte für jede Signatur bestimmt. Die dafür erforderliche Identifizierung der zu einem Kalibriertarget gehörenden Fluoreszenzemission kann beispielsweise durch volumenerhaltende Schwellwertverfahren oder durch Mittelung der Segmentierungsergebnisse bei Schwellwertvariation erfolgen.

Bei Kalibriertargets in Gestalt von fluorochrommarkierten Objektregionen mit multispektraler Signatur (polychromatisch) wird der chromatische Versatz genauso bestimmt.

Als fluorochrommarkierte Kalibrierregionen eignen sich insbesondere auch Zentromerregionen, die mit einer Probenkombination von solchen DNA-Sequenzen hybridisiert werden, die alle an dieselben chromosomalen DNA-Abschnitte binden, jedoch mit Fluorochromen unterschiedlichen spektraler Signatur markiert wird. Erfolgt die Hybridisierung unter hoch stringenten Bedingungen, liegen pro Zellkern zwei Markierungsregionen vor; bei nieder-stringenten Bedingungen werden aufgrund zusätzlicher Nebenbindungsregionen zusätzliche Zentromerregionen markiert, so daß die Zahl der Kalibrierungsregionen ansteigt. Das ist u.U. sehr von Vorteil.

(IV) Die beschriebenen Meßverfahren können auch in Kombination mit Axialtomographie durchgeführt werden. Hierfür wird das biologische Mikroobjekt, z.B. ein Zellkern, in dem die zu ortenden Meßstrukturen bereits mit Fluorochromen markiert sind und das auch bereits Kalibriertargets enthält (zur Präparation siehe Beispiel 1), auf einer Glasfaser oder in der Mikrokapillare angeordnet. Mit dem Axialtomograph wird das Objekt Schritt für Schritt um einen definierten Winkel gedreht unter ggf. automatischer Refokussierung. Von jedem Winkelschritt wird ein kompletter 2D oder 3D-Bildstapel aufgenommen.

Die Drehung erfolgt in der Art, daß jeweils ein Abstand zwischen zwei Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets (d.h. zwischen deren Fluoreszenzintensitätsschwerpunkten) maximal wird. Der maximale gemessene Abstand entspricht dem tatsächlichen Abstand.

Ist man nur an den Abständen zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets, d.h. nicht an ihrer absoluten räumlichen Anordnung interessiert, kann man nun von einer der bekannten Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets aus fortfahren, den Abstand zu einer dritten Meßstruktur bzw. einem dritten Kalibriertarget zu maximieren und zu bestimmen. Sind die Abstände zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion, so genügt eine einzige spektrale Signatur; sind die Abstände dagegen kleiner, müssen die Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets durch multispektrale Signatur unterschieden werden. Die Schwerpunkte (Maxima) der Signale dienen der Lokalisierung. Sofern die untersuchten Meßstrukturen einen Durchmesser haben, der kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion ist, werden alle Beugungsbilder der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets durch eine scharfe Punktbildfunktion bestimmt, so daß die Maxima optimal bestimmt werden können.

Ist man an der absoluten Anordnung der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets im Raum interessiert, so müssen die jeweiligen Schwerpunkte (sog. "Baryzentren") präzise bestimmt werden. Durch mehrmaliges Wiederholen der gesamten Meßprozedur und statistische Auswertung kann die absolute Lokalisierung der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets, d.h. die Winkelmessung, verbessert werden.

Anstatt wie vorstehend beschrieben die Kalibrierung und die Distanzmessung zwischen den zu ortenden Strukturen, d.h. Meßstrukturen, in demselben biologischen Objekt durchzuführen, kann man auch die Kalibrierung unabhängig von den Meßstrukturen an gleichartigen biologischen Objekten durchführen. Bei dieser Verfahrensvariante ist die Unterscheidung zwischen den Fluoreszenzsignalen der Kalibriertargets und denjenigen der Meßstrukturen erleichtert. Anhand der mit den Kalibriertargets ermittelten Werte des optischen Versatzes kann man Eichkurven für die Distanzmessungen zwischen den Meßstrukturen erstellen. Derartige Eichkurven machen z.B. Angaben über den spektralen Versatz als Funktion von Brechungsindex und Absorption des verwendeten Immersionsmediums, der verwendeten Optik, Filter und Detektionseinheiten, der verwendeten Auswertalgorithmen, der verwendeten biologischen Objekte, der Lokalisation der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets in ihnen etc. Die Verwendung der Information aus diesen speziellen Eichkurven zur erfindungsgemäßen Distanzmessung bietet sich insbesondere in solchen Fällen an, bei denen einer größere Präzisionstoleranz verwendet erlaubt ist.

**BEISPIEL 3: Untersuchung und Darstellung von dreidimensional ausgedehnten Objekten mittels mehrdimensionaler Wellenfeldmikroskopie, erfindungsgemäßem Kalibrierverfahren und simultaner Bildaufnahme**

Üblicherweise wird von einem biologischen Mikroobjekt ein 3D-Datensatz durch sequentielle Registrierung gewonnen, z.B. in der konfokalen Laserscanningmikroskopie durch punktwises oder linienweises Abscannen des 3D-Objektvolumens; ein zweites Verfahren beruht auf der Registrierung der Fluoreszenzemission aus der Objektebene durch Positionierung eines Detektorarrays in der zu der Objektebene konjugierten Zwischenbildebene. üblicherweise ist die Position dieser Zwischenbildebene fixiert; um 3D-Informationen über das biologische Objekt zu erhalten, wird dieses sequentiell durch die zu der festen Zwischenbildebene konjugierte Objektebene hindurch bewegt; jedesmal wird ein 2D-Bilddatensatz der betreffenden Fluoreszenzemission registriert; und/oder das Objekt wird mit Hilfe axialtomographischer Verfahren um verschiedene Drehwinkel gedreht, wobei jedesmal 2D-Datensätze der zu der festen Zwischenbildebene konjugierten

Objektebene registriert werden.

Diese sequentielle Registrierung von Objektpunkten, Objektlinien oder Objektebenen hat verschiedene Nachteile: Z.B. kann ein Ausbleichen der Registrierung des 3D-Datensatzes zu einer Verschiebung der erfindungsgemäß bestimmten 3D-Schwerpunkte der Fluoreszenzverteilung von markierten Objektpunkten einer bestimmten spektralen Signatur führen. Ein anderer Nachteil besteht darin, daß die 3D-Datenaufnahme nicht schnell genug erfolgt, um auch bei nicht permanent stabil, d.h. sich bewegenden Objekten, insbesondere bei in vivo Markierungen wie z.B. bei fluoreszenzmarkierten Chromosomenregionen in Kernen lebender Zellen, die sich unter physiologischen Bedingungen mit Geschwindigkeiten bis zu einigen nm/sec (mittlere Verschiebung) bewegen können, eine befriedigende Bildqualität zu gewährleisten.

Um auch bei sich bewegenden Objekten eine befriedigende Abbildungsqualität zu erhalten, sieht die vorliegende Erfindung eine simultane Aufnahme des 3D-Datensatzes eines fluoreszenzmarkierten Objektes vor. Hierzu wird das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht einer gegebenen spektralen Signatur durch optische Elemente, z.B. Teilerspiegel, aufgespalten in  $N$  Teilstrahlen und auf  $N$  Detektorarrays abgebildet, die sich in  $N$  verschiedenen Zwischenbildebenen befinden, die zu  $N$  verschiedenen Objektebenen konjugiert sind. Eine einfache Abschätzung aufgrund der Abbildungsgleichung ergibt, daß die Abstände der Zwischenbildebenen (Detektorebenen) bei simultaner Registrierung eines Objektbereiches mit  $10\text{ }\mu\text{m}$  axialer Ausdehnung und eines Objektivs von konventioneller Bildweite und hoher numerischer Apertur z.B. um einen Bereich in der Größenordnung  $\leq 20\text{ cm}$  variiert werden müssen (abhängig vom verwendeten Objektiv). Durch weitere  $N$  Zwischenoptiken können die für Hochpräzisionsdistanzmessungen in relevanten Objektbereichen zu registrierenden  $N$  Objektebenen auch auf verschiedene Bereiche desselben, geeignet groß dimensionierten Detektorarrays (bzw. auf  $L < N$  Detektorarrays) abgebildet werden. In diesem Falle entspricht einem bestimmten Ausschnitt des/der  $L$  Detektorarrays eine der  $N$  konjugierten Objektebenen. Beispielsweise wird ein kleiner Objektbereich von wenigen  $\mu\text{m}$  Ausdehnung zur Vermessung in der Wellenfeldmikroskopie zunächst so grob positioniert, daß sein Schwerpunkt etwa im Zentrum des durch die Detektionspunktbildfunktion für eine bestimmte (Zwischen)Bildebene  $B_0$  gegebenen Beobachtungsvolumens des zur Registrierung verwendeten Mikroskopobjektivs liegt;

das vom 3D-Objekt ausgehende Fluoreszenzlicht wird nach seinen spektralen Signaturen getrennt und in N Teilstrahlen aufgespalten, die auf N Detektorarrays (von z.B. je 8 x 8, 16 x 16 oder 64 x 64 Pixelgröße) abgebildet werden, deren Positionierung die Registrierung der Fluoreszenzemission aus N konjugierten Objektebenen um das Maximum der Detektionspunktbildfunktion (bezogen auf die Bildebene  $B_0$ ) gestattet.

Beispielsweise sind bei simultaner Aufnahme von Objekten mit einem Abstand von jeweils 20 nm nach einer einfachen Abschätzung unter obigen Annahmen Verschiebungen der konjugierten Zwischenbildebenen um jeweils wenige 100  $\mu\text{m}$  (in der Nähe des Maximums der Punktbildfunktion) erforderlich; bzw. entsprechend kleine optische individuelle Korrekturen sind bei simultaner Detektion der relevanten Objektausschnitte auf einem einzigen (oder  $L < N$ ) Detektorarray(s) entsprechender Pixelzahlen auszuführen. Bei einer Teilung der Fluoreszenzemission z.B. in  $N=20$  Teilstrahlen gleicher Intensität vermindert sich die Anzahl der von jedem der  $N=20$  Detektorarray(s) (bzw. -

Ausschnitte) pro Zeiteinheit registrierten Photonenzahl um etwa den gleichen Faktor.

Die Lokalisationsgenauigkeit eines fluoreszenzmarkierten Objektes vermindert sich dann aufgrund der verschlechterten Photonenzahlstatistik um schätzungsweise einen Faktor  $\sqrt{20}$

Dieser Nachteil kann durch eine Erhöhung der Registrierungszeit um den Faktor N (z.B.  $N=20$ ) beseitigt werden. In diesem Falle dauert die simultane Registrierung des Objektes etwa ebensolange wie bei sequentieller Registrierung. Bei Objekten mit Ausbleichverhalten besteht der Vorteil der simultanen dreidimensionalen Registrierung jedoch in einer für alle Targets (einer gegebenen spektralen Signatur) des Beobachtungsvolumens ähnlichen (bzw. ähnlicherem) Ausbleichverhalten; durch Ausbleichen verursachte Verschiebungen des Schwerpunktes des Fluoreszenzemissionsbildes werden hierdurch vermindert.

Bei Objekten mit zeitlich dynamischer Struktur (z.B. markierte Zellen in vivo) wird bei einer gegenüber der sequentiellen Registrierung um den Faktor N verkürzten Aufnahmezeit (z.B. 1 sec statt 20 sec) die Lokalisationsgenauigkeit der einzelnen Objektpunkte um schätzungsweise den Faktor  $\sqrt{N}$  (bei  $N=20$  z.B. 4.5) vermindert.

Beispielsweise ergibt sich bei einer 3D Lokalisationsgenauigkeit im Wellenfeldmikroskop von ca.  $\pm 3$  nm, erhalten mit sequentiellen Aufnahmezeiten von 1 sec pro Bildebene, unter den genannten Bedingungen bei simultaner Registrierung (1 sec) eine Verminderung auf eine Lokalisationsgenauigkeit auf schätzungsweise  $\pm 4.5 \cdot 3$  nm  $\approx 14$  nm bei simulta-

ner Aufnahme von 20 Objektebenen unter sonst gleichen Bedingungen. Bei einer (als Beispiel) angenommenen Objektbewegung (mittlere Verschiebung) von 5 nm/sec wäre die tatsächliche Lokalisationsungenauigkeit bei einer sequentiellen Aufnahme mit einer Gesamtregistrierungszeit von 20 sec bereits ohne Berücksichtigung von Ausbleicheffekten jedoch erheblich größer. Erfindungsgemäß ist hier die beschriebene simultane Registrierung von Objektebenen nicht nur hinsichtlich einer optischen Achse, sondern auch hinsichtlich zwei und drei orthogonalen optischen Achsen. Bei Bedarf kann diese erfindungsgemäße simultane Bildaufnahme ohne weiteres mit einer herkömmlichen sequentiellen Bildaufnahme kombiniert werden.

#### **BEISPIEL 4 : DNA-Sequenzierung mittels mehrdimensionaler Wellenfeldmikroskopie**

Mittels bekannter Verfahren wie z.B. der Polymerase-Kettenreaktion werden alle komplementären Subsequenzen der zu analysierenden DNA-Sequenz hergestellt. Die Subsequenzen beginnen alle am selben Nukleotid der zu analysierenden Sequenz. Die zu analysierenden Bruchstücke werden alle am 3' Ende mit einem Bezugsfluorochrommarker  $\alpha$  markiert. Am anderen Ende, dem 5'-Ende, bzw. an definierten Zwischenstellen werden sie jeweils mit einem Fluorochrommarker a, g, c, t verschiedener spektraler Signatur markiert, je nachdem ob das Nukleotid die Base Adenin (Marker a), Guanin (Marker g), Cytosin (Marker c) oder Thymin (Marker t) trägt.

Alle Typen der verwendeten Fluorochrommarker unterscheiden sich in ihrer spektralen Signatur derart, daß die Fluorochrommarker  $\alpha$ , a, g, c, t (ggf. noch weitere) getrennt voneinander detektiert werden können; ein bestimmter Fluorochrommarker kann erfindungsgemäß von einem bis vielen Fluorochrommolekülen des gleichen oder verschiedenen Typs gebildet werden, wobei die Länge und Zusammensetzung der Fluorochrommarker erfindungsgemäß so gewählt wird, daß Distanzmessungen zwischen den Schwerpunkten der Intensitätsverteilungen von anfangsständigem Fluorochrommarker  $\alpha$  und endständigen Fluoreszenzmarkern (entweder a, oder g, oder c, oder t, oder ggf. weitere für weitere Basen) mit dem Verfahren der mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskopie möglich ist, d.h. Linkermoleküle für Fluoreszenzmarker müssen dabei beispielsweise

kürzer als  $1/2$  Nukleotiddurchmesser sein. Erfindungsgemäß ist auch die Verwendung von längeren Linkermolekülen möglich, sofern diese eine Konfiguration von so hoher Steifigkeit besitzen, daß die durch sie verursachte Distanzvariation genügend klein ist, beispielsweise  $< 1/2$  Nukleotiddurchmesser beträgt.

Diese so markierten Subsequenzen repräsentieren die zu analysierende DNA-Sequenz vollständig. Die Fluoreszenzmarker a, g, c, t bzw. das Bezugsfluorochrom  $\alpha$  können jeweils ein oder mehrere Fluorochrommoleküle enthalten. Die DNA-Subsequenzen werden alle so auf geeignete Träger fixiert, daß sie als lineare Sequenz vorliegen.

Die fluorochrommarkierten DNA-Stücke werden mit Hilfe von DNA-Combing-Techniken linear ausgerichtet. Im Unterschied zum herkömmlichen "eindimensionalen" Wellenfeldmikroskop ist bei dem erfindungsgemäßen mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop eine zusätzliche präzise Ausrichtung der DNA-Stränge in Richtung der optischen Achse des Systems nicht mehr notwendig. Die DNA-Sequenzen werden vorzugsweise auf eine viereckige Glasfaser aufgebracht, deren Brechungsindex sich von demjenigen des umgebenden Mediums in minimaler Weise unterscheidet, wobei die Ausrichtung in einem bestimmten Winkel, insbesondere orthogonal zur Achse der Glasfaser erfolgt, und wobei der mittlere Abstand der Schwerpunkte der DNA-Sequenzen voneinander größer ist als die maximale Halbwertsbreite der zur Registrierung der Fluoreszenzsignale verwendeten Punktbildfunktionen. Ein weiteres Verfahren bindet das 3' Ende an ein Mikrokügelchen der spektralen Signatur  $\alpha$  und streckt anschließend den DNA-Faden mit dem Werkzeug der optischen Pinzette, wobei der "Pinzettenlaser" in seiner Wellenlänge geeignet gewählt werden muß.

Nach Linearisierung bzw. Orientierung der DNA-Sequenzen wird das so hergestellte Präparat fixiert und die molekulare Bewegung z.B. durch Temperaturniedrigung reduziert. Alternativ können die DNA-Enden auch in eine kristallin geordnete Festkörperstruktur eingebettet werden. Für die Messung wurden zu Zwecken der Kalibrierung weitere, insbesondere polychromatische Mikroobjekte auf die Glasfaser, den DNA-Objektträger oder in den Fixierungsfestkörper der DNA-Enden eingebracht. Die Kalibrierungsobjekte enthalten zusätzlich eine spektrale Signatur, die nicht a, t, c oder g ist. Die Linearisierung der DNA-Stränge kann entfallen, wenn alle Nukleotiden bei der Syn-

these des zu analysierenden DNA-Komplementärstranges geeignet fluoreszenzmarkiert werden.

Die fixierten DNA-Sequenzen werden in ein mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop eingebracht, wobei die linearen DNA-Subsequenzen so zu den stehenden Wellenfronten orientiert werden, daß eine exakte Abstandsmessung (Genauigkeit  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) zwischen  $\alpha$  und a bzw. g, c oder t — nach Bestimmung der Intensitätsbaryzentren und Kalibrierung der Abbildungseigenschaften — möglich ist.

Die Messung erfolgt bei in situ Kalibrierung unter Anwendung des erfindungsgemäßen Kalibrierverfahrens. Die Signale der Fluorochrommarker werden im Wellenfeldmikroskop mit geeignet angepaßten Schrittweiten spektral getrennt voneinander registriert (bevorzugt in digitaler Weise). Aus den Abständen der fluoreszenten Markern und ihrer spektralen Signatur läßt sich die DNA-Basensequenz des zu analysierenden DNA-Stückes bestimmen.

Statt einer spektralen Trennung oder zusätzlich zu ihr können auch Fluoreszenzlebensdauerparameter analysiert werden. In einer ersten Phase der Auswertung wird eine Grobbestimmung der Schwerpunkte der Fluorochrommarker-Signale vorgenommen und auf der Grundlage dieser Information die zu einer DNA-Sequenz gehörenden Signale nach den oben genannten Distanzkriterien von den zu einer anderen DNA-Sequenz gehörenden Signalen getrennt; in einer zweiten Phase der Auswertung werden die spektral getrennt registrierten, modulierten Signale der Fluorochrommarker mit Hilfe von geeignet angepaßten Funktionen analysiert; hieraus werden die Abstände z.B. der Schwerpunkte der anfangs- und endständigen Fluorochrommarker-Signale einer DNA-Sequenz voneinander mit molekularer Präzision bestimmt, wobei die an den Kalibrierungsobjekten vorgenommenen Messungen für eine Korrektur von Distanzaberrationen, z.B. chromatischer Verschiebungen, herangezogen werden; in einer dritten Phase der Auswertung werden die den Längen der DNA-Sequenzen entsprechenden Abstände der Fluorochrommarker-Signale nach zunehmender Länge getrennt nach Typus des endständigen Fluorochrommarkers (z.B. a, g, c, t) geordnet; die so erreichte Anordnung entspricht dem bei einem herkömmlichen Verfahren erzielten Muster, dem dann nach bekannten Methoden die gewünschte Sequenzinformation entnommen werden kann.

Bei Makromolekülen linearer Sequenz bzw. bekannter geordneter Struktur geht man



analog vor, wobei die Zahl und Art der Fluorochrommarker von Zahl und Art der Molekülbausteine abhängt.

Falls die Vermessung einzelner DNA-Stränge deren Ausrichtung in Richtung der optischen Achse erforderlich macht, kann erfindungsgemäß wie folgt verfahren werden: Das bekannte Ende der DNA-Kette wird zusätzlich zu einem Fluoreszenzmarker der spektralen Signatur  $\alpha$  mit einem chemischen "Marker" markiert. Der Rest der DNA-Kettenpräparation, insbesondere die Markierung der endständigen Fluoreszenzmarker a, c, g und t (Stopnukleotide) wird wie anfangs beschrieben durchgeführt. Die endständigen Basen und/oder die Marker der Stopnukleotide und ggf. weitere Basen der auszurichtenden DNA-Ketten tragen eine elektrische Ladung (z.B. negativ).

Die Ausrichtung der DNA-Ketten kann vor oder während der Mikroskopie erfolgen, zunächst wird das Verfahren der Ausrichtung vor der Mikroskopie beschrieben.

Die präparierten DNA-Ketten werden in Lösung in einem Puffer niedriger Ionenstärke auf einen speziell beschichteten Objektträger (oder Deckglas, was im folgenden auch als Objektträger bezeichnet werden soll) aufgebracht, der das chemisch markierte 3' Ende jeder DNA-Kette binden ("ankleben") kann. Der Lösung wird nun eine immobilisierende Komponente zugegeben, die nach einer bestimmten Zeit eine Aushärtung der DNA-Ketten in Lösung bewirkt. Der Objektträger wird mit einem (unbeschichteten) Deckglas abgedeckt und versiegelt, wobei der Abstand von Objektträger zum Deckglas mit einem geeigneten "Spacer" (z.B. einer dünnen Membran) auf einen wohldefinierten Wert eingestellt werden kann. Der so versiegelte Objektträger wird einem geeigneten homogenen, statischen elektrischen Feld ausgesetzt, welches die elektrisch geladenen Basen ausrichtet. Die Polung des elektrischen Feldes (beispielsweise des eines Kondensators) muß hierbei so angelegt sein, daß bei negativ (positiv) geladenen Basen die Kathode (Anode) bei dem beschichteten Objektträger (mit den "angeklebten" 3' Enden) und die Anode (Kathode) bei dem unbeschichteten Deckglas liegt. Die elektrischen Feldlinien verlaufen senkrecht zur Objektträgeroberfläche und die Stärke des elektrischen Feldes wird ausreichend hoch gewählt, um eine Ausrichtung der DNA-Ketten in der Lösung zu bewirken.

Nachdem die so ausgerichteten DNA-Ketten in dem Zwischenraum Objektträger – Deckglas immobilisiert sind, werden sie mit dem mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskop wie vorstehend beschrieben aufgenommen bzw. vermessen.

Soll die Orientierung der DNA-Ketten während der mikroskopischen Aufnahme erfolgen, wird das oben beschriebene elektrische Feld erfindungsgemäß nach dem folgenden Verfahren aufgebaut:

Der beschichtete Objektträger ist ein elektrisch leitender Spiegel hinreichender Planität. Die Lösung der DNA-Ketten (niedrige Ionenstärke) ist geeignet viskos und es werden keine immobilisierenden Komponenten der Lösung zugegeben. Auch hier wird wieder (ggf. unter Verwendung eines geeigneten Spacers) ein Deckglas aufgebracht und versiegelt. Das Wellenfeld wird nun mit nur einem Objektiv in Verbindung mit dem Spiegel erzeugt, wobei das aus dem Objektiv austretende Anregungslicht vom Spiegel reflektiert wird und sich ein eindimensionales Wellenfeld (parallel zur Fokalebene oder zur Spiegeloberfläche) ausbildet. Das Anlegen einer positiven (negativen) Spannung bei der Verwendung von negativ (positiv) geladenen Basen bewirkt ebenfalls eine Ausrichtung der DNA-Ketten senkrecht zur Oberfläche des Spiegels, also entlang der optischen Achse des Mikroskops und die nun wie vorstehend beschrieben sequenziert werden können. Auch bei diesem Verfahren muß die Stärke des elektrischen Feldes groß genug sein, um die Ausrichtung der DNA-Ketten zu bewirken; thermische Bewegungen der Moleküle können z.B. durch Temperaturniedrigung reduziert werden.

Analog diesem Beispiel kann mit beliebigen anderen linearisierten Makromolekülen verfahren werden.

#### **BEISPIEL 5: Mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop Typ II mit lateraler räumlich modulierter Fluoreszenzanregung**

Das mehrdimensionale Wellenfeldmikroskop Typ II umfaßt in der Raumrichtungen  $x$  eine reelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen, einen Strahlteiler zur Auskopplung von Teilstrahlen als virtuelle Beleuchtungsquelle, und ein erstes Objektiv, das

diesen beiden Beleuchtungsquellen zugeordnet ist. In dieses erste Objektiv werden die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquellen derart eingekoppelt, daß sie auf der hinteren, dem Objektraum abgewandten Fokalebene (diese Ebene wird auch "back focal plane" genannt.) zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte erzeugen bzw. aufweisen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen in einem bestimmten Winkel aufeinander zu verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren:

Fokussiert man einen Lichtstrahl (Lichtwellenzug) mit einem geeigneten Abstand zur optischen Achse in diese Fokalebene, (die optische Achse steht senkrecht auf der Fokalebene und verläuft durch deren Mittelpunkt) so verläßt im Objektraum ein paralleles Lichtbündel mit ebenen Wellenfronten das Objektiv, und zwar unter einem bestimmten Winkel zur optischen Achse. Dieser Winkel ist variabel einstellbar, je nach dem, mit welchem Abstand zu optischer Achse die Lichtstrahlen in das Objektiv eingekoppelt werden und um welche Art von Objektiv es sich handelt.

Koppelt man den zweiten Lichtstrahlen (Lichtwellenzüge) unter einem solchen Winkel zu dem ersten und zur optischen Achse in dasselbe Objektiv ein, daß sein Fokuspunkt auf der hinteren Fokalebene diametral gegenüber dem Fokuspunkt des ersten Lichtstrahls liegt, daß also Fokuspunkt 1 — optische Achse — Fokuspunkt 2 eine Linie auf der hinteren Fokalebene bilden, entsteht in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen ein zweites paralleles Lichtbündel mit ebenen Wellenfronten, das in einem bestimmten Winkel zu dem ersten verläuft und mit diesem im Objektraum zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld mit Streifen maximaler Lichtintensität interferiert.

Dem ersten Objektiv ist ein zweites Objektiv mit Abstand spiegelbildlich gegenüber angeordnet, so daß diese beiden Objektive auf zwei gegenüber liegenden Seiten des dreidimensionalen Objektraums liegen. Diesem zweiten Objektiv ist eine dritte und eine vierte (reelle oder virtuelle) Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen so zugeordnet, daß man die Lichtstrahlen beider Beleuchtungsquellen — wie für das erste Objektiv beschrieben — auf die hintere, d.h. dem Objektraum abgewandte Fokalebene dieses zweiten Objektives fokussieren kann, in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen dieses zweiten Objektives zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld inter-

ferieren lassen kann, und im Objektraum mit dem eindimensionalen stehenden Wellenfeld des ersten Objektives so zur Interferenz bringen kann, so daß ein dreidimensionales Wellenfeld entsteht, mit Punkten maximaler Intensität, die sich im dreidimensionalen Raum fortsetzen.

Für die Erzeugung eines zweidimensionalen Wellenfeldes (d.h. Punkte maximaler Intensität in einer Ebene), wird der beschriebene Aufbau insoweit abgewandelt, daß man entweder erstes und zweites Objektiv einsetzt, eines davon aber nur mit einer Beleuchtungsquelle kombiniert,

oder man setzt nur ein einziges Objektiv ein und kombiniert dieses mit einer dritten Beleuchtungsquelle, deren kohärenzfähige Lichtstrahlen man derart zu den Lichtstrahlen der beiden anderen Beleuchtungsquellen in dieses einzige Objektiv einkoppelt, daß die korrespondierenden drei Fokuspunkte auf der Fokalebene ein gleichschenkliges Dreieck bilden, durch dessen Mittelpunkt die optische Achse verläuft. Im Objektraum verlassen alle drei Lichtstrahlen das Mikroskopobjektiv mit dem gleichen Winkel zur optischen Achse aber jeder in eine andere Richtung.

Diese Variante des erfindungsgemäßen Wellenfeldmikroskops Typ II zur Erzeugung eines mehrdimensionalen Wellenfeldmikroskops unter Verwendung eines einzigen Objektivs kann auch zur Erzeugung eines dreidimensionalen Wellenfelds eingesetzt werden. Dazu lenkt man vier Lichtstrahlen in dasselbe Objektiv und zwar derart, daß die dazu korrespondierenden vier Fokuspunkte in der hinteren Fokalebene ein gleichseitiges Viereck bilden.

38  
A n s p r ü c h e

1. Wellenfeldmikroskop mit einem Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, das eine Beleuchtungsquelle, ein erstes Objektiv und ein zweites Objektiv oder einen Reflektor umfaßt, wobei erstes Objektiv und zweites Objektiv oder Reflektor derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines eindimensionalen stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum, der Halte und Manöviervorrichtung(en) für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv, ein Okular und einen Detektor umfaßt, dadurch gekennzeichnet,

daß das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in zwei oder allen drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Reflektor oder Strahlteiler zur Auskopplung von Teilstrahlen oder eine weitere Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen umfaßt, denen jeweils wenigstens ein Objektiv zugeordnet ist, und die jeweils zur Erzeugung von Lichtwellenzügen geeignet sind, wobei die Lichtwellenzüge der einen Beleuchtungsquelle antiparallel oder in variabel einstellbaren Winkeln zu den Lichtwellenzügen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle ausgerichtet sind, derart, daß die von der einen Beleuchtungsquelle ausgesendeten Lichtwellenzüge mit denen des Reflektors bzw. der anderen Beleuchtungsquelle zu einem stehenden Wellenfeld mit ebenen Wellenfronten interferieren,

und daß das Detektionssystem wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur, welches mit seiner optischen Achse senkrecht zu den Wellenfronten eines der interferierenden Wellenfelder angeordnet ist, umfaßt, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann, wobei dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet ist, und dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist.

2. Wellenfeldmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in wenigstens einer Raumrichtung einem Objektiv hoher numerischer Apertur ein Objektiv niedriger numerischer Apertur oder ein Reflektor zugeordnet ist, und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) entweder zwei Objektive niedriger numerischer Apertur oder ein Objektiv niedriger numerischer Apertur und ein Reflektor einander zugeordnet sind.
3. Wellenfeldmikroskop mit einem Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem, das eine Beleuchtungsquelle und ein Objektiv umfaßt, die derart zueinander angeordnet sind, daß sie zur Erzeugung eines stehenden Wellenfeldes geeignet sind, mit einem Objektraum, der Halte- und Manöviervorrichtung(en) für ein Objekt umfaßt, und mit einem Detektionssystem, das ein Objektiv, ein Okular und einen Detektor umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen wenigstens eine reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl aufweist, denen ein gemeinsames Objektiv zugeordnet ist, in das die Lichtstrahlen bzw. Lichtwellenzüge der Beleuchtungsquelle(n) und des/der Strahlteiler(s) derart einkoppelbar sind, daß sie auf der hinteren (dem Objektraum abgewandten) Fokalebene zwei voneinander beabstandete Fokuspunkte aufweisen und in dem Raum zwischen den beiden Fokalebenen in variabel einstellbarem Winkel zueinander verlaufen und zu einem eindimensionalen stehenden Wellenfeld interferieren, und daß das Detektionssystem wenigstens ein zur epifluoreszenten Detektion geeignetes und/oder wenigstens ein zur rasternden Punktdetektion geeignetes Detektionsobjektiv vorzugsweise hoher numerischer Apertur umfaßt, das auch mit einem Objektiv des Anregungssystems identisch sein kann, wobei dem zur epifluoreszenten Detektion geeigneten Detektionsobjektiv ein flächiger (zweidimensionaler) Detektor, z.B. eine Kamera vorgeordnet ist, und dem zur rasternden Punktdetektion geeigneten Detektionsobjektiv wenigstens eine feststehende konfokale Detektionsringblende und/oder -lochblende und/oder wenigstens ein feststehender Detektionsschlitz vorgeordnet und ein Punktdetektor, insbesondere ein Photomultiplier, eine Photodiode oder eine Diodenarray nachgeordnet ist

4. Wellenfeldmikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungs- bzw. Anregungssystem in derselben oder einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) jeweils wenigstens eine weitere reelle oder virtuelle Beleuchtungsquelle für kohärenzfähige Lichtstrahlen und/oder wenigstens einen Strahlteiler zur Auskopplung von wenigstens einem Teilstrahl aufweist, dem/denen jeweils ein weiteres Objektiv zugeordnet ist, durch das der/die Lichtstrahlen (Lichtwellenzüge) in den Objektraum gelenkt und derart ausgerichtet sind, daß sie mit den Lichtstrahlen aus derselben oder aus der /den beiden anderen Raumrichtung(en) bzw. dem von diesen gebildeten ein- oder zweidimensionalen Wellenfeld zu einem zwei- bzw. dreidimensionalen Wellenfeld interferieren.
5. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Objektraum eine Objekthalterung umfaßt, in bzw. an der das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder gegebenenfalls Kalibriertarget(s) um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar in dem Wellenfeld gelagert ist, wobei für wenigstens eine Achse eine Drehbarkeit um 360-Grad ( $2\pi$ ) bevorzugt ist.
6. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die das mehrdimensionale Wellenfeld erzeugende(n) Beleuchtungsquellen und/oder der/die Reflektoren und/oder der/die Strahlteiler und/oder das/die Objektiv(e) und damit das mehrdimensionale Wellenfeld um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen drehbar ist/sind.
7. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Detektionssystem ein Scannerspiegel vorgesehen und derart angeordnet ist, daß er zur Abbildung der lateralen Objektbereiche mit der gewünschten, vorzugsweise maximalen Fluoreszenzintensität geeignet ist.

8. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungssystem in wenigstens einer der drei Raumrichtungen eine reelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung und in einer oder beiden anderen Raumrichtung(en) eine reelle und/oder virtuelle Beleuchtungsquelle für die Zwei- oder Mehrphotonenanregung umfaßt, und daß die damit erzeugten stehenden Wellenfelder ( $WF_1, WF_2, \dots, WF_i$ ) voneinander verschiedene Wellenlängen ( $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$ ) und Distanzen ( $d_1, d_2, \dots, d_i$ ) zwischen den jeweiligen Wellenmaxima bzw. Wellenminima von  $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos\theta_1$  bzw.  $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos\theta_2$  bzw.  $d_i = \lambda_i / 2n \cos\theta_i$  aufweisen (mit:  $n$  = Brechungsindex im Objektraum,  $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_i$  = Kreuzungswinkel des Lichtwellenzugs der Wellenlänge  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$  mit der optischen Achse), und wobei die Wellenfelder  $WF_1, WF_2, \dots, W_i$  derart zueinander ausgerichtet sind, daß sich mindestens ein Maximum zweier oder aller stehenden Wellen an derselben Stelle (nämlich dem Ort einer Mehrphotonenanregung) befindet.
  
9. Wellenfeldmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine Anordnung aus Beleuchtungsquelle, Objektiv und einem elektrisch leitenden Spiegel, die zur Erzeugung eines eindimensionalen, elektrischen Wellenfeldes geeignet ist, relativ zur Objektträgerhalterung vorgesehen ist, und zwar derart, daß die in dem Objekt befindlichen Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets durch Anlegen des elektrischen Feldes — vor oder während des mikroskopischen Meßvorgangs — ausrichtbar sind.
  
10. Wellenfeldmikroskopieverfahren zur DNA-Sequenzierung unter Verwendung eines Wellenfeldmikroskops nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
  - es werden alle komplementären Subsequenzen der zu analysierenden DNA-Sequenz derart hergestellt, daß alle Subsequenzen am selben Nukleotid der zu analysierenden Sequenz beginnen,
  - die zu analysierenden Bruchstücke werden alle am 3'-Ende mit einem Bezugsfluorochrommarker  $\alpha$  und am 5'-Ende und/oder an definierten Zwischenstellen mit einem Fluorochrommarker a, g, c, oder t — je nachdem ob das Nukleotid die Base Adenin



(Marker a), Guanin (Marker g), Cytosin (Marker c) oder Thymin (Marker t) trägt — markiert, wobei die Fluorochrommarker a, g, c, t und  $\alpha$  verschiedene spektrale Signatur aufweisen, und jeweils ein oder mehrere Fluorochrommoleküle enthalten,

die markierten DNA-Subsequenzen werden derart auf Träger fixiert, daß sie als lineare Sequenz vorliegen, und in ein mehrdimensionales Wellenfeldmikroskop eingebracht, wobei die linearen DNA-Subsequenzen so zu den stehenden Wellenfronten orientiert werden, daß eine exakte Abstandsmessung (Genauigkeit  $\leq 1 \cdot 10^{-10}$  m) zwischen  $\alpha$  und a bzw. g, c oder t nach Bestimmung der Intensitätsbaryzentren und Kalibrierung der Abbildungseigenschaften durchführbar ist,

indem die Signale der Fluorochrommarker schrittweise, spektral getrennt voneinander registriert werden,

und aus den Abständen der fluoreszenten Markern und ihrer spektralen Signatur die DNA-Basensequenz des zu analysierenden DNA-Stückes bestimmt wird.

11. Kalibrierverfahren für die mehrdimensionale Wellenfeldmikroskopie nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem

vor, während oder nach der Präparation des betreffenden Objekts auf einem bzw. in einem Objekthalter, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser, Objektträgerkapillare oder Objektträgerflüssigkeit, die zu untersuchenden bzw. zu ortenden Objektstrukturen — ist gleich Meßstrukturen — mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert werden, wobei zumindest solche zu ortenden Meßstrukturen, deren Abstand voneinander geringer ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener spektraler Signatur markiert werden,

mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert werden,

die fluoreszierenden Kalibriertargets entweder zusammen mit den Objekten bzw. Meßstrukturen oder separat auf bzw. in dem/ einem Objekthalter präpariert werden,

Meßstrukturen und Kalibriertargets unter übereinstimmenden Bedingungen, gleichzeitig oder nacheinander mikroskopisch untersucht werden,

und bei dem jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisa-

tionsverhaltens des jeweiligen optischen Systems vermessen werden, die dabei ermittelten Messwerte — gleich Ist-Werte — mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten — gleich Soll-Werten — verglichen werden, und aus der Differenz zwischen Ist-Werten und Soll-Werten ein Korrekturwert — ist gleich Kalibrierwert — bestimmt wird, mit dem der durch das optische System bedingte Versatz in der Detektion unterschiedlicher Emissionsloci, insbesondere der Meßstrukturen, korrigiert wird. dadadurch gekennzeichnet,

daß das biologische Objekt mit den fluorochrommarkierten Meßstrukturen und/oder fluorochrommarkierten Kalibriertarget(s) sequentiell oder simultan mit einzelnen (separaten), in zwei oder drei Raumrichtungen orthogonal zueinander verlaufenden, stehenden und zu einem zwei- oder dreidimensionalen Wellenfeld miteinander interferierenden Wellenfeldern beleuchtet wird, wobei die Fluorochrome zur Fluoreszenzemission angeregt werden,

daß zur Detektion der Fluoreszenzintensität eine Kamera und/oder eine oder mehrere zweidimensionale Anordnung(en) aus Einzeldetektoren mit jeweils kreis-, ring- oder schlitzförmiger Blende oder eine Anordnung von mehreren kreis-, ring- oder schlitzförmigen Blenden verwendet wird/werden,

daß entweder das Objekt mit den Meßstrukturen und/oder Kalibriertarget(s) oder das ein- bzw. zweidimensionale Wellenfeld oder beides während des Meßvorgangs schrittweise um eine oder zwei orthogonal zueinander verlaufende Achsen gedreht wird, wobei die fluorochrommarkierten Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets sequentiell oder simultan mit einem oder zwei einzelnen, orthogonal zueinander stehenden Wellenfeldern beleuchtet werden.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

Absender: ANMELDEAMT

<b>An</b>  An die WIPO World Intellectual Property Organization 34, chemin des Colombettes  CH-1211 Genf 20	<b>PCT</b>  <b>MITTEILUNG ÜBER DIE ENTSCHEIDUNG ÜBER DEN ANTRAG AUF BERICHTIGUNG</b>  (Artikel 91.1 f) PCT)
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  <b>crs-3</b>	Absendedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>28.12.98</b>
Internationales Aktenzeichen  <b>PCT/DE 98/01908</b>	ANTWORT FÄLLIG  ENTFÄLLT Siehe aber letzter Absatz unten
Anmelder  <b>Ruprecht-Karls-Universität</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>09. Juli 1998 (09.07.1998)</b>

Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß das Anmeldeamt den Antrag auf Berichtigung offensichtlicher Fehler im Antrag der internationalen Anmeldung geprüft und entschieden hat,

1. ☒ der Berichtigung zuzustimmen:
- ☐ wie vom Anmelder beantragt.
- ☐ im nachstehend angegebenen Umfang\*:


2. ☒ die Berichtigung aus folgenden Gründen ganz oder teilweise abzulehnen\*:

**Bei dem Antrag handelt es sich nicht um einen Berichtigungsantrag für einen für jedermann offensichtlichen Fehler. Dem Antrag konnte daher nicht entsprochen werden. Ihr Antrag wird nunmehr aufgeteilt behandelt:**

- 2 -

Ein Exemplar dieser Mitteilung ist zusammen mit einer Kopie des Antrags des Anmelders auf Berichtigung dem Internationalen Büro übermittelt worden.

\* Wird die Berichtigung ganz oder teilweise abgelehnt, so kann der Anmelder das Internationale Büro vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung und unter Entrichtung einer Gebühr auffordern, den Berichtigungsantrag zusammen mit der internationalen Anmeldung zu veröffentlichen. Siehe hierzu Regel 91.1 f), dritter und vierter Satz, sowie - zur Höhe der Gebühr - PCT-Leitfaden für Anmelder, Band 1, Anlage B 2 (WO).

Name und Postanschrift des Anmeldeamts  <b>DEUTSCHES PATENTAMT</b> 80297 München Telefaxnr. (089) 21 95 - 2221	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Laubersheimer</b>  Telefonnr. (089) 21 95 - <del>2120</del> <b>2120</b>
--	---

- 2 -

1) Verzicht auf die Bestimmung EA

2) Antrag auf Bestätigung einer vorsorglichen Bestimmung

Zu 1)

dem Antrag kann entsprochen werden.

Zu 2)

Die Bestätigung einer vorsorglichen Bestimmung (hier EP) ist nicht mehr möglich, da diese Frist mit dem Ablauf von 15 Monaten ab Prioritätsdatum abgelaufen war (siehe Regel 4.9c AusfOPCT).

Dr. Ulrike Rudolph

Patentanwältin  
European Patent Attorney

69198 Schriesheim, den 11. 12. 1998  
In der Schanz 10

☎ 06203-61348  
Fax 06203-64196

Patentanwältin Dr. U. Rudolph, In der Schanz 10, 69198 Schriesheim

An das  
Deutsche Patent-und Markenamt  
— Anmeldeamt gem. PCT —

80297 München

**vorab per Telefax: 089 - 2195 - 2221**

betrifft: Internationale Patentanmeldung **PCT/DE 98/01908**

"Wellenfeldmikroskop, Wellenfeldmikroskopieverfahren, auch zur DNA-  
Sequenzierung, und Kalibrierverfahren für die Wellenfeldmikroskopie "  
Anmelderin: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

mein Zeichen: cre-3

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit stelle ich Antrag auf Berichtigung gemäß PCTAusfO R. 91.1 d), R. 91.1.e) i) und  
R. 91.1.f) und beantrage,

die von mir in dem PCT-Antrag zu der o.g. PCT-Anmeldung versehentlich falsch  
vorgenommene Bestimmung von EA ( Eurasisches Patent) dahingehend zu  
berichtigen, daß sie durch die immer beabsichtigte Bestimmung von EP (Europäisches  
Patent) ersetzt wird.

Dieser Antrag wird wie folgt begründet:

Die ungewollte Bestimmung von EA anstelle von EP ist auf ein Schreibversehen zurückzuführen, denn es war nie etwas anderes beabsichtigt als neben den Vertragsstaaten US, CA, JP und AU noch EP zu bestimmen. Ich muß beim Setzen des Kreuzchens aus Versehen ein Kästchen höher als beabsichtigt geraten sein, und habe dies Versehen aufgrund der schriftbildlichen Ähnlichkeit zwischen EA und EP nicht bemerkt. Der Fehler wurde von mir erst gestern abend, am 10.12.98, bei der Übermittlung des Recherchenberichts und des Hinweises auf die ablaufende Frist zum Eintritt in die nationalen und regionale Phase festgestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt war ich in dem festen Glauben, auch in dieser PCT-Anmeldung "EP" für ein Europäisches Patent bestimmt zu haben. Zum Beweis übersende ich den beiliegenden Schriftsatz (Anlage 6) vom 15. 9.1998 an den zuständigen Ansprechpartner der Anmelderin, Herrn Dr. Klaus Kobek (TLB GmbH an den Hochschulen Baden Württembergs, Karlsruhe).

Die beigelegte Kopie des Auftrags zur Ausarbeitung und Einreichung der betreffenden PCT-Anmeldung (Anlage 1) belegt, daß von Anfang an die Bestimmung der fünf Vertragsstaaten US, CA, JP, AU und EP beabsichtigt war. Diese Bestimmungspraxis stimmt außerdem mit der Vorgehensweise in allen übrigen (vier) von mir vertretenen PCT-Anmeldungen der Ruprecht-Karls-Universität überein (siehe Anlagen 2 bis 5), gemäß der bei jeder PCT Anmeldung zumindest diese 5 Vertragsstaaten wirksam bestimmt wurden. Die Zweckmäßigkeit der Bestimmung zumindest von Europa, Japan und USA liegt im Fall der in Rede stehenden PCT-Anmeldung außerdem schon allein aufgrund des technischen Anwendungsgebiets der Erfindung auf der Hand bzw. drängt sich dem Fachmann geradezu auf, denn die Hauptproduzenten von technisch hochentwickelten Mikroskopen haben Ihren Sitz in Deutschland, USA und Japan, wobei der Absatzmarkt der Deutschen Unternehmen schwerpunktmäßig in Europa liegt. Auch die beiden PCT-Anmeldungen PCT/DE97/02994 und PCT/DE98/00491, die auf dieselben Erfinder bzw. Miterfinder zurückgehen, sind für EP US, JP, CA und AU bestimmt — und nicht für EA.

Schließlich stimmen auch die von mir persönlich verfaßten Vollmachturkunden (Anlage 7) mit dieser Bestimmungspraxis und Beabsichtigung der Bestimmung von u.a. dem Europäischen Patentamt überein, indem sie ausdrücklich meine Bevollmächtigung zur Vertretung vor dem Europäischen Patentamt umfassen.

Nach alledem erscheint der eingangs gestellte Berichtigungsantrag gerechtfertigt und ich bitte darum, ihn baldmöglichst (**vor Offenlegung der WO-Schrift Mitte Januar 1999!**) zu bewilligen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Ulrike Rudolph

Anlagen:

- (1) Auftragsschreiben zur PCT/DE 98/01908
- (2) PCT-Antrag zum Internationalen Aktenzeichen PCT/DE 97/02994
- (3) PCT-Antrag zum Internationalen Aktenzeichen PCT/DE 98/00491
- (4) PCT-Antrag zum Internationalen Aktenzeichen PCT/DE 97/00107
- (5) PCT-Antrag zum Internationalen Aktenzeichen PCT/DE 96/01979
- (6) mein Schreiben im Glauben der korrekten Bestimmung von EP
- (7) Vollmachturkunden zur PCT/DE 98/01908

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/01908

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N21/64 G02B21/06 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY) 18 August 1994	1
X	see page 3, line 12 - page 4, line 2 see page 13, last paragraph - page 16, line 17	3,7
Y	see page 18, line 11 - page 22, line 11 see page 23, line 1 - page 25, line 18; figures 1-8	10
Y	EP 0 732 584 A (IBM) 18 September 1996 see column 5, line 28 - line 42 see column 13, line 39 - line 45 see column 14, line 7 - line 28 see column 16, line 41 - column 17, line 7 see column 17, line 17 - line 22 see figure 8	10
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1998

Date of mailing of the international search report

04/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/01908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY)  10 October 1996  see page 4, last paragraph  see page 12, line 18 - line 20  see page 57, line 13 - line 15  see page 70, line 18 - line 26  see page 71, line 12 - page 72, line 33  see page 92, paragraph 1  see page 140, line 1 - line 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	10,11
A	<p>B.BAILEY et al: "Optical subsectioning and multiple focal-plan imaging in the standing-wave fluorescence microscope"  PROCEEDINGS 52nd ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159  XP002085004  see page 159, line 15 - line 17</p> <p style="text-align: center;">---</p>	11
A	<p>WO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA)  8 August 1996  see page 3, line 14 - page 4, line 11  see page 6, line 26 - page 7, line 6  see page 15, line 6 - page 17, line 27;  figures 2-6</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>W. DENK ET AL: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy"  SCIENCE.,  vol. 248, no. 4951, 6 April 1990, pages 73-76, XP000381741  Washington DC  cited in the application  see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	8
A	<p>US 4 621 911 A (LANNI) 11 November 1986  cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>V. KRISHNAMURTHI ET AL: "Image processing in 3-D standing-wave fluorescence microscopy"  PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING,  vol. 2655, - 1996 pages 18-25,  XP002085003</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01908

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9418594 A	18-08-1994	US 5394268 A	28-02-1995
		AU 691173 B	14-05-1998
		AU 6169994 A	29-08-1994
		CA 2155521 A	18-08-1994
		EP 0682780 A	22-11-1995
		JP 8509817 T	15-10-1996
		US 5801881 A	01-09-1998
EP 0732584 A	18-09-1996	US 5624845 A	29-04-1997
		US 5609744 A	11-03-1997
		US 5607568 A	04-03-1997
		US 5538898 A	23-07-1996
		JP 8256755 A	08-10-1996
WO 9631522 A	10-10-1996	US 5720928 A	24-02-1998
		AU 5532196 A	23-10-1996
		EP 0871640 A	21-10-1998
WO 9624082 A	08-08-1996	US 5671085 A	23-09-1997
		AU 4773896 A	21-08-1996
		CA 2210801 A	08-08-1996
		EP 0807273 A	19-11-1997
US 4621911 A	11-11-1986	NONE	

PCT/DE 98/01908

IPK 6 G01N21/64 G02B21/06 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 GOIN

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 18594 A (CARNEGIE MELLON UNIVERSITY) 18. August 1994	1
X	siehe Seite 3, Zeile 12 - Seite 4, Zeile 2 siehe Seite 13, letzter Absatz - Seite 16, Zeile 17 siehe Seite 18, Zeile 11 - Seite 22, Zeile 11	3,7
Y	siehe Seite 23, Zeile 1 - Seite 25, Zeile 18; Abbildungen 1-8 ---	10
Y	EP 0 732 584 A (IBM) 18. September 1996 siehe Spalte 5, Zeile 28 - Zeile 42 siehe Spalte 13, Zeile 39 - Zeile 45 siehe Spalte 14, Zeile 7 - Zeile 28 siehe Spalte 16, Zeile 41 - Spalte 17, Zeile 7 siehe Spalte 17, Zeile 17 - Zeile 22 siehe Abbildung 8 ---	10

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

**X** Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>3</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

„L“ Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

γ) Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomas, R.M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 96 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY)  10. Oktober 1996  siehe Seite 4, letzter Absatz  siehe Seite 12, Zeile 18 - Zeile 20  siehe Seite 57, Zeile 13 - Zeile 15  siehe Seite 70, Zeile 18 - Zeile 26  siehe Seite 71, Zeile 12 - Seite 72, Zeile 33  siehe Seite 92, Absatz 1  siehe Seite 140, Zeile 1 - Zeile 3</p> <p>---</p>	10,11
A	<p>B.BAILEY et al: "Optical subsectioning and multiple focal-plan imaging in the standing-wave fluorescence microscope"  PROCEEDINGS 52nd ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159  XP002085004  siehe Seite 159, Zeile 15 - Zeile 17</p> <p>---</p>	11
A	<p>WO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA)  8. August 1996  siehe Seite 3, Zeile 14 - Seite 4, Zeile 11  siehe Seite 6, Zeile 26 - Seite 7, Zeile 6  siehe Seite 15, Zeile 6 - Seite 17, Zeile 27; Abbildungen 2-6</p> <p>---</p>	1
A	<p>W. DENK ET AL: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy"  SCIENCE., Bd. 248, Nr. 4951, 6. April 1990, Seiten 73-76, XP000381741  Washington DC  in der Anmeldung erwähnt  siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	8
A	<p>US 4 621 911 A (LANNI) 11. November 1986  in der Anmeldung erwähnt</p> <p>---</p>	
A	<p>V. KRISHNAMURTHI ET AL: "Image processing in 3-D standing-wave fluorescence microscopy"  PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, Bd. 2655, - 1996 Seiten 18-25, XP002085003</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Ir ... s Aktenzeichen

PCT/DE 98/01908

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9418594 A	18-08-1994	US 5394268 A	28-02-1995
		AU 691173 B	14-05-1998
		AU 6169994 A	29-08-1994
		CA 2155521 A	18-08-1994
		EP 0682780 A	22-11-1995
		JP 8509817 T	15-10-1996
		US 5801881 A	01-09-1998
EP 0732584 A	18-09-1996	US 5624845 A	29-04-1997
		US 5609744 A	11-03-1997
		US 5607568 A	04-03-1997
		US 5538898 A	23-07-1996
		JP 8256755 A	08-10-1996
WO 9631522 A	10-10-1996	US 5720928 A	24-02-1998
		AU 5532196 A	23-10-1996
		EP 0871640 A	21-10-1998
WO 9624082 A	08-08-1996	US 5671085 A	23-09-1997
		AU 4773896 A	21-08-1996
		CA 2210801 A	08-08-1996
		EP 0807273 A	19-11-1997
US 4621911 A	11-11-1986	KEINE	